Catarina Joelma Magalhães Braga

Pesquisa de novos adjuvantes para vacinas terapêuticas

Tese apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

São Paulo
2011

Catarina Joelma Magalhães Braga

Pesquisa de novos adjuvantes para vacinas terapêuticas

Tese apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão corrigida: a versão original se encontra na secretaria de pós-graduação do ICB-II

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Braga, Catarina Joelma Magalhães.
Pesquisa de novos adjuvantes para vacinas terapêuticas / Catarina Joelma Magalhães Braga. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Luís Carlos de Souza Ferreira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de vacinas.

Versão do título para o inglês: Development of new adjuvantes for therapeutic vaccine.

Descritores: 1. Flagelina 2. Adjuvante 3. Célula T 4. HIV 5. Câncer 6. HPV-16 I. Ferreira, Luís Carlos de Souza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0147/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Catarina Joelma Magalhães Braga

Título da Tese: Pesquisa de novos adjuvantes para vacinas terapêuticas

Orientador: Luís Carlos de Souza Ferreira

A comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) **Aprovado(a)** ( ) **Reprovado(a)**

1) Examinador(a) Nome completo:.....
Instituição:.....

2) Examinador(a) Nome completo:.....
Instituição:.....

3) Examinador(a) Nome completo:.....
Instituição:.....

4) Examinador(a) Nome completo:.....
Instituição:.....

5) Presidente: Nome completo:.....
Instituição:.....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091 7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.35 .10
NOSC/mcgn

São Paulo, 23 de julho de 2010.

REF.: Protocolo nº56/07.

"Pesquisa de novos adjuvantes para vacinas terapêuticas voltadas para o controle do HIV-1 e tumores induzidos pelo HPV-16"

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 16.10.2013.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. NIELS OLSEN SARAIVA CÂMARA
Vice-Coordenador da Comissão de Ética
no Uso de Animal - ICB /USP

Ilmo.Sr.
Prof Dr. **LUIS CARLOS DE SOUZA FERREIRA**
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Aos amigos,
parceiros de minha vida
uma pequena dedicatória.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Luís Carlos de Souza Ferreira, pelo apóio e orientação necessários ao desenvolvimento do presente trabalho, e pela amizada sincera.

À Dra. Elisabete Sbrogio, pela participação em muitas das etapas deste trabalho, pelo apóio nas horas difíceis e carinho “de mãe” com o qual sempre me acolheu.

À Mariana, pelas discussões científicas e ajuda em alguns ensaios, pela identificação pessoal e amizade que excede o ambiente do laboratório e traz momentos alegres.

À Juliana, pelas discussões científicas, “viagens”; e pela amizade.

À Aline e Carol por compartilharem da “simples” tarefa de estudar “O potencial adjuvante das flagelinas de *Salmonella* e *Bacillus*”.

Ao Rafael, pela ajuda nas purificações de proteínas, e por não perder o “sotaque” cearense.

À Loren pelo apóio técnico e, principalmente, pela amizade que aquece a minha vida.

À Prof. Rita Ferreira, pelos conselhos profissionais e oportunidades.

Ao Prof. Maurício Rodrigues da UNIFESP, por toda contribuição para a execução das metodologias utilizadas neste trabalho, colaborações e ampliação dos meus conhecimentos.

Ao Prof. Carlos Taborda da USP e seus alunos Julian, Márcia e Glauce pelas colaborações, parcerias, dicas para a realização deste trabalho, e pela amizade alegre.

Aos colegas do laboratório CEVAT-GENE 3 e 4: Roberto, Karine, Eduardo, Liliana, Rogério, Camila, Priscila, Deni, Naomi, Milene, Renata, Wilson, Bruna, Cariri, Vinícius, Otto, Jaime e demais recentemente ingressos, pelas dicas e momentos de descontração, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

Ao Eduardo Gimenes, pelo apóio nas tarefas de compras, contatos com vendedores, manuseio de verbas e consertos.

À Dra. Sandra Alexandre, Juliane Afonso e Luís, pela dedicação ao biotério da parasitologia e aos animais de experimentação importantíssimos para a realização deste trabalho, e pela amizada que compartilhamos.

Ao Prof. Armando da USP e seus alunos Luís Farinha e Yordanca, pela colaboração e pela amizade.

À Profa. Elaine Rodrigues da UNIFESP e seu aluno Filipe, pela colaboração e troca de informações.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia Naíde e Aninha, e ao Celso do ICB III, pela ajuda com questões burocráticas, e pela amizade.

Aos funcionários da biblioteca, pricipalmente a Tereza e a Mônica, pela atenção nesta fase final de entrega de teses.

À Dra. Mickie do Butantã, pela parceria produtiva e pela amizade.

À Profa. Silvia Boscardin, pelas conversas, colaborações, dicas de informática, amizade e "por fim" pela oportunidade de iniciar uma nova fase científica.

Aos meus amigos Andréia, Caio, Juliano, Otacílio (Odair) e tantos outros, pelos momentos de descontração.

À minha família, meus amigos, de ontem, hoje e sempre: Sérgio, Claudinha, Ana Cristina, Susete-Maria, Márcia/Carioca, Augusta, Aline, Moacir, Isabelle/Gorete, Mariana Diniz e o mais novo membro Luís Guilherme, pelo carinho que não diminui nunca, pela torcida e admiração que me movimentam e, principalmente, por existirem em minha vida.

Aos meus amigos do teatro, Jany & Cia (Pedrinho e Yasmine), Danilo, Priscila, Renata, Caetano (Thiago), Aninha, Tomas e Adriana, pela convivência e por contribuírem tanto para meu crescimento cultural-pessoal e bem-estar mental e físico.

À Bia (nossa diretora), pela amizade, convivência e contribuíções nas artes cênicas, mas que vão além desse âmbito e, principalmente, pela frase: "*Não esqueça de respirar*"

Este trabalho foi realizado com apóio financeiro da FAPESP, CNPq e INCTV.

Muito Obrigada!

"Entender é sempre limitado.
Mas não entender pode não ter fronteiras.
Sinto que sou muito mais completa
quando não entendo.
Não entender,
do modo como falo, é um dom.
Não entender,
mas não como um simples de espírito.
O bom é ser inteligente e não entender.
É uma benção estranha,
como ter loucura sem ser doida.
É um desinteresse manso,
é uma doçura de burrice.
Só que de vez em quando vem a inquietação:
quero entender um pouco.
Não demais: pelo menos entender que não entendo"

Clarice Lispector

RESUMO

BRAGA, C. J. M. **Pesquisa de novos adjuvantes para vacinas terapêuticas.** 2011. 159 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A busca por adjuvantes capazes de estimular eficiente resposta imunológica celular representa uma importante contribuição para a pesquisa de vacinas. No presente trabalho avaliamos o potencial adjuvante de flagelinas de *Salmonella* para a ativação de linfócitos T, com ênfase na ativação de linfócitos T $CD8^+$. Para este fim, animais foram submetidos a diferentes estratégias vacinais que incluíram vacinas baseadas em linhagens atenuadas de *Salmonella* nas quais flagelinas híbridas foram expressas fusionadas geneticamente ao antígeno alvo; vacinas acelulares que empregaram flagelinas purificadas co-administradas, ou em fusão, a antígenos alvo e, ainda, vacinas de DNA que codificam para flagelina fusionada ao antígeno alvo. Além disso, utilizamos alguns dos principais antígenos envolvidos no desenvolvimento de vacinas contra AIDS, câncer cervical, malária e paracoccidioidomicose para avaliação da ativação de células T $CD8^+$, e quando possível de células T $CD4^+$. Os resultados obtidos demonstram que a flagelina, na forma de proteína purificada, foi capaz de promover discreta ativação de linfócitos $TCD4^+$ e T $CD8^+$ específicos. Os resultados indicam que o efeito adjuvante pode ser acentuado quando antígeno e flagelina são fisicamente ligados. No entanto, esse requerimento não foi observado quando antígenos peptídeos foram utilizados, ou ainda, quando resposta humoral ou de células T $CD4^+$ são desejadas. Por fim, nossos resultados demonstram que a utilização de flagelina na forma de vacina de DNA induziu maior proteção terapêutica que a mesma formulação utilizada na forma de vacinas de subunidades, sugerindo que os efeitos adjuvantes da flagelina para ativação de CTLs estão relacionados não apenas a ligação ao TLR5, mas também ao IPAF/Naip5. Os resultados apresentados no presente trabalho contribuem de forma significativa para a compreensão dos mecanismos de adjuvanticidade da flagelina de *Salmonella*, particularmente no contexto da ativação de respostas mediadas por células T.

Palavras-chave: Adjuvante. Flagelina. Células T. *Salmonella*. Vacinas Terapêuticas.

ABSTRACT

BRAGA, C. J. M. **Development of New Adjuvants for Therapeutic vaccine.** 2011. 159 p. Ph. D. thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The search for adjuvants that are able to stimulate an efficient cellular immune response represents an important contribution in vaccine development. In this study, we evaluated the potential of *Salmonella* flagellin as adjuvant for activation of T lymphocytes, with emphasis on the activation of $CD8^+$ T cells. To this end, mice were submitted to different approaches such as vaccines based on attenuated *Salmonella* strains that expressed hybrid flagellin genetically fusioned to antigen; acellular vaccines with purified flagellin co-administered or genetically fusioned to the target antigen; or even DNA vaccines, that encode flagellin genetically fusioned to antigen. In addition, we explored some of the major antigens involved in the development of vaccines against AIDS, cervical cancer, malaria and PCM to assess the activation of $CD8^+$ T cells, and when possible of $CD4^+$ T cells. Purified flagellins were able to promote activation discreet of antigen-specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. The results also suggest that the adjuvant effect may be enhanced when antigen and flagellin are physically linked, but this is a requirement only for protein antigens and it is not required when antigen peptides are used, or when humoral immune response or $CD4^+$ T cells activation are desired. Finally, our results demonstrate that the use of flagellin in the form of DNA vaccines induced greater therapeutic protection than the same formulation used in the form of subunit vaccines, suggesting that the adjuvant effects of flagellin to the activation of CTLs are related not only to link to TLR5, but also to IPAF/Naip5. The results presented in this work contribute significantly to the understanding of the mechanisms of flagellin adjuvanticity, particularly in the context of activation of responses mediated by T cells.

Key words: Adjuvant. Flagellin. T cells. *Salmonella*. Therapeutic Vaccine.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	*Acquired Immune Deficiency Syndrome* (Síndrome da imunodeficiência adquirida)
APC	*Antigen presenting cell* (célula apresentadora de antígeno)
AP-1	*Activator protein* (proteína ativadora)
CFA	*Complet Freund Adjuvant* (Adjuvante completo de Freund)
CFSE	Carboxyfluorescein fluorescein diacetate, succinimidyl Ester
COX-2	Ciclooxigenase 2 (cicloxigenase 2)
CpG	Oligodeoxinucleotídeos contendo sequências CG não metiladas
CS	Circunsporozoita
CTL	*Cytotoxic T lymphocyte* (linfócito T citotóxico)
CTP-3	Epítopo 3 da sub-unidade B da toxina colérica
DCs	*Dendritic cells* (células dendríticas)
DMEM	Meio Dulbecco modificado
DNA	*Desoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)
E	*Early protein* (proteína de expressão precoce)
ELISPOT	*Enzyme-Linked Immunosorbent Spot*
EU	*Endotox unit* (Unidade endotóxica)
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
FliC*d*	Flagelina sorotipo d
FliC*i*	Flagelina sorotipo i
FITC	Fluoresceína
gD	Glicoproteína D
gp43	Glicoproteína de 43 kDa
HBV	*Hepatitis B virus* (vírus da Hepatite B)
HIV-1	*human immunodeficiency virus type 1* (vírus da imunodeficiência humana tipo 1)
HLA	*Human leukocyte antigen* (antígeno leucocitário humano)

HPV	*Human papilloma virus* (vírus do papiloma humano)
HPRT	*hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*
HSP	*Heat shock protein* (proteína de choque térmico)
HSV	*Herpes simplex virus* (vírus herpes simplex)
ICAM	*Intercellular adhesion molecule* (molécula de adesão intercelular)
IFN-ɣ	Interferon-ɣ
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IPAF	ICE(IL-1β–*converting enzyme*) *protease activating fa*ctor
iNOS	óxido nítrico sintetase induzível
KAN	Kanamicin (canamicina)
L	*Late protein* (proteína de expressão tardia)
LB	Meio Luria-Bertani
LPS	lipopolissacarídeo
MHC	*Major histocompatibility complex* (Complexo principal de histocompatibilidade)
MyD88	*Myeloid differentiation primary response gene* (Fator de diferenciação mielóide88)
Naip5	*NLR apoptosis-inhibitory protein 5*
NF-κB	*Nuclear factor kappa B* (Fator nuclear kappa B)
NLR	*Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeate containing receptors*
NO	óxido nítrico
PAMPS	*Pathogen-associated molecular patterns*
Pb	*Paracoccidioides brasilienses*
PBS	*Phosphatase buffered saline* (tampão salina fosfato)
PBS-T	*Phosphatase buffered saline* plus tween 20 (tampão salina fosfato mais 0,5% de tween 20)
PCR	*Polymeraso chain reaction* (reação de polimerase em cadeia)
PCM	Paracoccidioidomicose

PE	Ficoeritrina
PRRs	*Pattern-recognition receptors*
q.s.p	Quantidade suficiente para
RLRs	*Retinoic acid-inducible gene I (RIG-1)-like receptors*
RNA	*Ribonucleic acid* RT-PCR
RSV	*Rous sarcoma vírus* (vírus rous sarcoma)
RT-PCR	*Reverse Transcriptase-PCR*
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de duodecilsulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SV40	*Smian virus 40* (vírus 40 de simian)
TAP	*Transporter associated protein* (proteína associada a transporte)
Th	T *helper* (linfócito T auxiliar)
TGF	Fator de transformação do crescimento
TNF	*Tumor necrosis factor* (fator de necrose tumoral)
TNFR	*Tumor necrosis factor receptor* (receptor para o fator de necrose tumoral)
TLR	*Toll-like receptor* (receptor semelhante ao Toll)
Treg	Células T reguladoras
VCAM	Molécula de adesão de célula vascular
VLPs	*Virus like particles* (partículas semelhantes a vírus)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Iniciação da resposta imunológica adaptativa..... 23
Figura 2 - Estrutura e organização da flagelina no flagelo bacteriano..... 27
Figura 3 - Sinalização celular mediada pela flagelina..... 29
Figura 4 - Representação esquemática do vetor pETFliCi..... 46
Figura 5 - Representação esquemática do vetor pFliC e pFliC-E7..... 49
Figura 6 - Purificação da flagelina recombinante por cromatografia de afinidade ao níquel..... 62
Figura 7 - Expressão e antigenicidade da proteína recombinante FliC de *Salmonella*..... 63
Figura 8 - Produção de IL-8 em células HEK293/TLR5^{+} estimuladas com flagelinas de *S.* Typhimurium..... 64
Figura 9 - Cinética da produção de IL-6 após estímulo *in vivo* com flagelinas de *S.* Typhimurium..... 65
Figura 10 - Expressão e antigenicidade da proteína recombinante p24 do HIV-1..... 67
Figura 11 - Análise da ativação de células T p24-específicas em camundongos imunizados pela via s.c. com formulação contendo flagelina como aduvante..... 69
Figura 12 - Citotoxicidade *in vivo* em camundongos imunizados via s.c. com p24 e flagelina como adjuvante..... 70
Figura 13 - Análise da ativação de células T CD4^{+} e T CD8^{+} p24-específicas em camundongos imunizados pela via s.c. com formulação contendo flagelina e peptídeo P10 como djuvantes..... 72
Figura 14 - Citotoxicidade *in vivo* em camundongos imunizados via s.c. com p24, flagelina e peptídeo P10 como adjuvantes..... 73
Figura 15 - Expressão e antigenicidade da proteína recombinante E7 do HPV-16..... 79
Figura 16 - Ensaio de proteção terapêutica em camundongos desafiados com células TC-1 via s.c. e imunizados com 4 doses de formulações contendo a proteína E7 e flagelina como adjuvante..... 80
Figura 17 - Ensaio de proteção terapêutica em camundongos desafiados com células TC-1 pela via i.v. e imunizados com 3 doses de formulações contendo a proteína E7 e flagelina como adjuvante..... 81
Figura 18 - Ensaio de proteção terapêutica em camundongos desafiados com células TC-1 pela via i.v. e imunizados com 4 doses de formulações contendo a proteína E7 e flagelina como adjuvante..... 82
Figura 19 - Detecção de citocinas nos pulmões de camundongos desafiados com células TC-1 pela via i.v. e imunizados com 4 doses de formulações contendo a proteína E7 e flagelina como adjuvante..... 84

Figura 20 - Detecção de citocinas nos pulmões de camundongos imunizados com 4 doses de formulações contendo a proteína E7 e flagelina como adjuvante..... 86
Figura 21 - Ensaio de proteção profilático-terapêutica em camundongos desafiados com células TC-1 pela via i.v. e imunizados com 5 doses de formulações contendo a proteína E7 e flagelina como adjuvante..... 88
Figura 22 - Ensaio de proteção terapêutica em camundongos desafiados com células TC-1 pela via i.v. e imunizados com 4 doses de formulações contendo o peptídeo T CD8 da proteína E7 (pepE7) e flagelina como adjuvante..... 89
Figura 23 - Detecção de citocinas nos pulmões de camundongos imunizados com 4 doses de formulações contendo o peptídeo P10 e flagelina como adjuvante..... 91
Figura 24 - Ensaio de proteção terapêutica em camundongos desafiados com células TC-1 pela via i.v. e imunizados com 4 doses de formulações contendo flagelina e peptídeo P10 como adjuvantes..... 92
Figura 25 - Expressão e funcionalidade de PRRs em células tumorais TC-1..... 94
Figura 26 - Avaliação do efeito anti-tumoral terapêutico em camundongos TLR5$^{-/-}$ desafiados com células TC-1 pela via s.c. e tratados com flagelina..... 96
Figura 27 - Avaliação do efeito anti-tumoral terapêutico em camundongos desafiados com células TC-1 via s.c. e imunizados com 1 dose dos plasmídeos pE7 ou pgDE7 e flagelina purificada como adjuvante..... 100
Figura 28 - Avaliação do efeito anti-tumoral terapêutico de formulações vacinais de DNA codificando o antígeno E7 em fusão a flagelina de *S.* Typhimurium..... 102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de PRRs por RT-PCR..... 56
Tabela 2 - Avaliação do desenvolvimento do tumor TC-1..... 99

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 19

1.1 Adjuvantes..... 20
1.2 Flagelina..... 25
1.3 Modelos de antígenos utilizados..... 32
1.3.1 Síndrome da imunodeficiência adquirida e o HIV..... 32
1.3.2 Câncer cervical e o HPV..... 34
1.3.3 Paracoccidioidomicose (PCM) e o P. brasilienses..... 36
1.3.4 Malária e o P. yoelli..... 39

2 OBJETIVOS..... 42

3 MATERIAL E MÉTODOS..... 44

3.1 Clonagem e purificação da flagelina recombinante..... 45
3.1.1 Clonagem do gene fliCi..... 45
3.1.2 Produção da flagelina recombinante..... 46
3.1.3 Purificação da flagelina recombinante..... 47
3.2 Purificação das proteínas recombinantes p24 e E7..... 47
3.3 Construção das vacinais de DNA..... 48
3.4 Linhagens celulares..... 50
3.5 Protocolos de imunização..... 50
3.6 Desafio dos animais com células tumorais TC-1..... 51
3.7 ELISA para detecção de anticorpos e citocinas..... 52
3.8 Ensaio de marcação intracelular de IFN-□ em células T..... 53
3.9 Enzyme-linked immunosorbent (ELISPOT)..... 53
3.10 Citotoxicidade *in vivo*..... 54
3.11 Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)..... 55
3.12 Análise estatística..... 56

4 RESULTADOS..... 57

4.1 Avaliação do potencial adjuvante da flagelina de S. Typhimurium (FliCi) e *S.* Muenchen (FliCd) para ativação de linfócitos T..... 58

4.1.1 Avaliação do potencial adjuvante da flagelina FliCi para ativação de linfócitos T CD4$^+$ e T CD8$^+$ específicos para o antígeno p24 do HIV-1..... 59

4.1.1.1 Descrição dos resultados..... 60
4.1.1.1.1 Clonagem, expressão e purificação da flagelina recombinante..... 60
4.1.1.1.2 Caracterização da atividade biológica da rFliC *in vitro*..... 63
4.1.1.1.3 Caracterização da atividade biológica da rFliC *in vivo*..... 64
4.1.1.1.4 Expressão e purificação da recombinante p24 do HIV..... 66

4.1.1.1.5 Avaliação do efeito adjuvante de rFliC para o antígeno p24 do HIV-1..... 68
4.1.1.2Discussão dos resultados..... 74

4.1.2 Avaliação do potencial adjuvante da flagelina FliCi para ativação de linfócitos T CD8$^+$ específicos para o antígeno E7 do HPV-16**..... 77

4.1.2.1 Descrição dos resultados..... 78
4.1.2.1.1 Expressão e purificação da proteína E7 do HPV-16..... 78
4.1.2.1.2 Avaliação do efeito anti-tumoral terapêutico de formulações vacinais que empregaram a flagelina rFliC como adjuvante para a proteína E7 do HPV-16..... 79
4.1.2.1.3 Avaliação das respostas imunológicas induzidas por formulações vacinais que empregaram rFliC como adjuvante para a proteína E7 do HPV-16..... 85
4.1.2.1.4 Avaliação do efeito anti-tumoral profilático-terapêutico de formulações vacinais que empregaram rFliC como adjuvante para a proteína E7 do HPV-16..... 87
4.1.2.1.5 Avaliação do efeito anti-tumoral terapêutico de formulações vacinais que empregaram rFliC como adjuvante para o peptídeo T CD8$^+$ da proteína E7 do HPV-16..... 88
4.1.2.1.6 Avaliação do efeito anti-tumoral terapêutico de formulações vacinais que empregam rFliC e peptídeo P10 como adjuvantes para a proteína E7 do HPV-16..... 90
4.1.2.1.7 Avaliação da expressão de receptores do tipo Toll e do tipo NOD em células tumorais TC-1..... 93
4.1.2.1.8 Avaliação do efeito anti-tumoral terapêutico em camundongos TLR5$^{-/-}$ imunizados com formulações que empregaram rFliC como adjuvante para a proteína E7 do HPV-16..... 95
4.1.2.1.9 Avaliação do efeito anti-tumoral terapêutico de formulações vacinais que empregam rFliC como adjuvante para uma vacina de DNA anti-tumor induzido por HPV-16..... 97
4.1.2.1.10 Avaliação do efeito anti-tumoral terapêutico de uma vacina de DNA que codifica a flagelina de *Salmonella* em fusão ao antígeno E7 do HPV-16..... 101
4.1.2.2 Discussão dos resultados..... 103

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 112

REFERÊNCIAS..... 116

ANEXOS..... 135
ANEXO A - Súmula Curricular..... 136
ANEXO B - Artigo publicado no *Infection and Immunity*..... 140
ANEXO C - Artigo publicado no *vaccine*..... 149

1 INTRODUÇÃO

1.1 Adjuvantes

A vacinação representa a estratégia de melhor custo-benefício para o controle de doenças infecciosas (O'HAGAN; VALIANTE, 2003). Ao longo da história, numerosas vacinas de sucesso foram desenvolvidas baseadas em microrganismos atenuados, inativados ou ainda nas toxinas que eles produzem como principais fatores de virulência. Dentre os exemplos de vacinas elaboradas a partir de microrganismos atenuados destacamos as vacinas contra varíola, rubéola, caxumba, sarampo, poliomelite e febre amarela; enquanto exemplos de vacinas elaboradas com microrganismos inteiros inativados, temos as vacinas contra a gripe, encefalite japonesa e coqueluche; e de toxinas transformadas em toxóides, temos as vacinas diftérica e tetânica. Apesar do sucesso, muitas dessas vacinas apresentaram efeitos adversos com a utilização em massa, o que impulsionou a busca por abordagens vacinais mais racionais, efetivas e, sobretudo, seguras. Assim, as vacinas contendo microrganismos inteiros foram substituídas por vacinas contendo antígenos altamente purificados ou ainda pela informação genética codificando antígenos relevantes do patógeno (O'HAGAN; RAPPUOLI, 2004). Infelizmente, vacinas baseadas em antígenos altamente purificados frequentemente induzem fraca resposta imunológica, tornando-se necessário a incorporação de adjuvantes para estimular adequadamente o sistema imunológico (PASHINE; VALIANTE; ULMER, 2005).

A palavra adjuvante deriva do latin "*adjuvare*" e significa "ajudar", sendo o termo adjuvante designado a qualquer composto capaz de aumentar a imonogenicidade intrínsica de um antígeno co-administrado ou modular a resposta imunológica naturalmente induzida contra o antígeno (KRIEG, 2007; LYCKE, 2010). Como conseqüência desta ampla definição, diferentes classes de compostos servem à função de adjuvante, como por exemplo, produtos de origem microbiana, sais minerais, citocinas, lipídeos, micropartículas, lipossomas, anticorpos dirigidos contra moléculas de superfície de APCs, dentre outros (PASHINE; VALIANTE; ULMER, 2005; BOSCARDIN et al., 2006). De acordo com o modo de ação, os adjuvantes podem ser classificados em dois tipos: imunopotencializadores e sistemas de entrega. Os imunopotencializadores ativam diretamente as células do sistema imunológico, enquanto os sistemas de entrega direcionam o(s) antígeno(s) e(ou) imunopotencializador(es) para alvos específicos do sistema imunológico, por

exemplo, células apresentadoras de antígenos (APCs) (O'HAGAN; VALIANTE, 2003).

Os sais de alumínio (Alum) foram os primeiros adjuvantes licenciados para uso em humanos e desde sua introdução em 1920 até meados do ano 2000 foram os únicos utilizados em vacinas. Uma importante característica dos sais de alumínio é que eles são excelentes indutores de imunidade humoral, mas contribuem muito pouco para o desenvolvimento de repostas celulares do tipo Th1 e ativação de linfócitos T $CD8^+$ (MIYAJI et al., 2011). É notável que durante quase um século esse adjuvante tenha sido utilizado sem o conhecimento preciso de seus mecanismos de ação, os quais foram elucidados apenas recentemente (DE GREGORIO; TRITTO; RAPPUOLI, 2008). De fato, a história de muitas vacinas de sucesso mostra que estas foram desenvolvidas empiricamente, utilizando-se métodos simples de inativação ou atenuação de patógenos ou de seus componentes. Contudo, o desenvolvimento de tais vacinas vai de encontro às exigências atuais, que requerem alta efetividade e longa duração, na ausência de efeitos adversos. Além disso, o âmbito de atuação das vacinas expandiu para além da profilaxia de doenças infecciosas, sendo utilizadas também no tratamento de muitas desordens patológicas ou condições fisiológicas anômalas tais como alergias, doenças auto-imunes, cânceres, demência (Alzheimer) e dependência química, ou mesmo na imunoterapia de doenças infecciosas crônicas, as quais não podem ser amenizadas por vacinas inativadas ou atenuadas, e para as quais Alum não exerce o efeito desejado.

A busca por novos adjuvantes para uso em humanos representa uma área em expansão na pesquisa médica. No entanto, nos últimos 15 anos apenas três adjuvantes: MF59 e AS03, duas emulsões formadas pela mistura de esqualeno ($C_{30}H_{50}$) em água (DUPUIS et al., 2001; GIUDICE, 2006) e o monofosforil lipídeo A (MPL), a forma detoxificada do LPS produzida a partir de *Salmonella* Minnessota (DIDIERLAURENT et al*.,* 2004) foram licenciados na Europa para uso em humanos nas formulações das vacinas FLUAD® (anti-influenza), Pandemrix® (A/H1N1) e Fendrix® (anti-HBV), respectivamente (PASHINE; VALIANTE; ULMER, 2005; MIYAJI et al., 2011). Além disso, muitos outros adjuvantes estão em fase de avaliação em ensaios pré-clínicos e clínicos ou aguardando validação; o que em geral é um processo lento, reflexo dos custos de desenvolvimento e restrições reguladoras atualmente requeridas para licenciamento.

A escassez de adjuvantes licenciados para uso em humanos mostra que existe uma carência de adjuvantes, principalmente para ativação de linfócitos T $CD4^+$ Th1 e linfócitos T $CD8^+$, e essa carência pode ser apontada como um dos principais obstáculos para o desenvolvimento de vacinas efetivas para o controle de doenças como malária, Chagas, AIDS, tuberculose e muitos tipos de cânceres, as quais requerem não apenas a imunidade mediada por anticorpos mas também a intervenção de linfócitos T citotóxicos (CTLs).

A descoberta de que para o adequado desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa (mediada por linfócitos B, T $CD4^+$ e T $CD8^+$) é necessária a ativação inicial de componentes da imunidade inata, revolucionou o conhecimento sobre como as vacinas trabalham para estimular o sistema imunológico. Hoje é amplamente difundido que a eficácia de uma vacina está intimamente relacionada ao seu potencial para ativar células da imunidade inata, sobretudo APCs tais como macrófagos e células dendríticas (DCs). Enquanto a ativação de linfócitos B virgens pode ocorrer diretamente pela ligação de seus receptores a antígenos solúveis ou na superfície do patógeno, a ativação de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ é restrita ao reconhecimento do antígeno no contexto MHC-II e MHC-I, respectivamente. Além disso, essas células necessitam de outros sinais, como moléculas co-estimuladoras e citocinas para que possam se diferenciar em células efetoras e de memória. As DCs são consideradas as mais potentes das APCs para estimulação de células T virgens, pois quando ativadas apresentam altos níveis de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80/86), aumentam a expressão de moléculas MHC e secretam citocinas pró-inflamatórias que promovem a diferenciação de linfócitos T $CD4^+$ em células Th1 ou Th2, ou de linfócitos T $CD8^+$ em CTLs (Figura 1). Além disso, células T $CD4^+$ são imprescindíveis para o desenvolvimento de linfócitos B efetores e de memória para antígenos timo-dependentes, e também fornecem estímulo para manutenção de linfócitos T $CD8^+$ de memória. DCs são consideradas ainda APCs profissionais uma vez que são especializadas na captura de antígenos nos sítios periféricos (mucosas e pele) e transporte/apresentação destes aos linfócitos concentrados nos órgãos linfóides secundários (linfonodos e baço), aumentando a probabilidade do encontro com o antígeno (STEINMAN; POPE, 2002; O'HAGAN; VALIANTE, 2003; CHUNG et al., 2004).

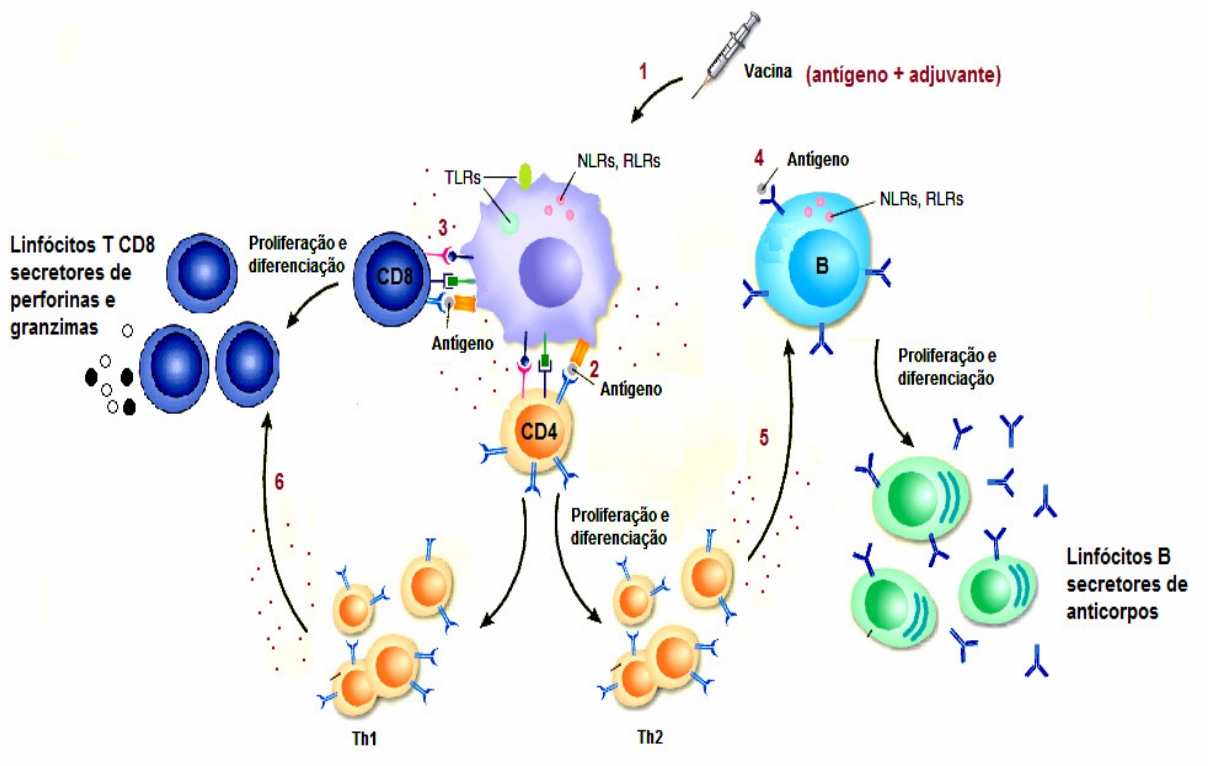


Figura 1 – Iniciação da resposta imunológica adaptativa. Células dendríticas são ativadas após a interação de PAMPS (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) com receptores da imunidade inata (TLRs, NLRs, RLRs) (1). DCs ativadas secretam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias enquanto apresentam em sua superfície moléculas co-estimuladoras e peptídeos derivados do antígeno em associação ao complexo MHC-II, para linfócitos T $CD4^+$ (2); ou MHC-I, para linfócitos T $CD8^+$ (3) promovendo a proliferação e a diferenciação destes. Linfócitos T $CD8^+$ se diferenciam em células T citotóxicas (CTLs) que matam células infectadas ou tumorais, enquanto linfócitos T $CD4^+$ se diferenciam em células T auxiliares (Th) do tipo Th1 ou Th2, que auxilam na diferenciação de CTLs (6) e células B (5), bem como no desenvolvimento de células de memória. Além disso, linfócitos B podem sofrer proliferação clonal e diferenciação em células secretoras de anticorpos (plasmócitos) pela ligação direta do antígeno a Igs de membrana, no entanto, é imprescindível o auxilío dos linfócitos T $CD4^+$ para a produção de anticorpos de alta qualidade (4). Fonte: Baseado em Krieg (2007).

Estudos recentes demonstraram que a ativação/maturação de DCs pode ser iniciada pela ligação de produtos solúveis a seus receptores. Desta forma, o emprego de adjuvantes que ativam DCs representa uma prioridade para o aumento da eficácia das vacinas. Além disso, a descoberta dos receptores Toll-like (TLRs) e seu papel na ativação de APCs impulsionou o desenvolvimento de vacinas, uma vez que a identificação e manipulação de seus ligantes oferecem a oportunidade para o desenvolvimento de novos adjuvantes. De fato, muitos agonistas de Toll estão sendo avaliados em ensaios pré-clínicos e clínicos. Dentre esses destacamos: MPL,

flagelina, CpG DNA (DNA de origem bacteriana rico em seqüências de citosina e guanosina não metiladas), ssRNA (RNA de fita simples), dsRNA (RNA fita dupla) e imidazol-quinoline. Além disso, algumas toxinas bacterians como a toxina colérica (CT) produzida por *Vibrio Cholerae*, toxina termo-lábil (LT) produzida por linhagens de *Escherichia coli* enterotoxigênicas, a toxina pertusis (PT) produzida por *Bordetella pertussis*, e ainda outros produtos como o peptídeo pan HLA-DR (PADRE), específico para células T $CD4^+$ (BARGIERI et al., 2008, 2010), proteínas de choque térmico (hsp) (do inglês "*heat shock protein"*), dentre outros também exercem efeito adjuvante e estão em avaliação (GOLDSTONE et al., 2002). Mais recentemente, algumas vias de sinalização celular estão em evidência como a via de sinalização mediada por receptores intracelulares Nod-like ("*Nod-like receptors*") e podem representar uma nova fonte de adjuvantes quando seus mecanimos de ação forem dissecados (DE GREGORIO; TRITTO; RAPPUOLI, 2008).

Apesar do acúmulo de conhecimentos sobre o sistema imunológico, interação patógeno-hospedeiro e identificação/produção de antígenos protetores, são notórias as dificuldades de traduzir essas informações em vacinas eficazes. Uma explicação plausível diz respeito à ausência de padronização de adjuvantes no tangente às características das respostas imunológicas que eles induzem, gerando divergências nos resultados obtidos; o que por sua vez é reflexo da contribuição de variáveis tais como o efeito intrínseco do adjuvante, a escolha e pureza do antígeno, a via de administração, a dose do antígeno e do adjuvante, o esquema de imunização; além de outras variáveis de difícil controle ou previsão como a genética do hospedeiro, status imunológico e a presença de condições fisiológicas ou patológicas. À luz dos conhecimentos atuais espera-se como qualidades de novos adjuvantes: (i) aumento da capacidade de reconhecimento antigênico em indivíduos classificados como maus respondedores; (ii) indução de respostas de longa duração (memória imunológica); (iii) indução de respostas imunológicas vigorosas em indivíduos imunocomprometidos fisiológicamente (neonatos, crianças e idosos) ou patologicamente (imunodeficientes ou transplantados); (iv) promoção de forte ativação de imunidade humoral, induzindo a produção de anticorpos com alta avidez e capacidade neutralizante e/ou resposta celular, ativando linfócitos T citotóxicos (CTL); (v) redução da quantidade de antígeno e do número de doses utilizadas, colaborando para a redução de custos e facilitação dos programas de vacinação em massa; (vi) ausência de toxicidade local e sistêmica, (vii) indução de resposta

imunológica em superfícies de mucosa, e (viii) facilidade de produção em larga escala (PASHINE; VALIANTE; ULMER, 2005). Além disso, é importante lembrar que o adjuvante pode encerrar uma ou mais dessas qualidades por diferentes mecanismos e, muitas vezes, a combinação de um ou mais adjuvantes será necessária para alcançar o efeito desejado.

1.2 Flagelina

Flagelina é a proteína mais abundante do flagelo bacteriano. Cerca de 20.000 a 100.000 cópias de flagelina são polimerizadas para formar o filamento flagelar, uma haste flexível e oca que, conectada ao gancho e ao corpo basal, formam a complexa estrutura denominada flagelo. O flagelo é exposto na superfície bacteriana e funciona como um propulsor mecânico, conferindo mobilidade à bactéria e um meio pelo qual estas podem aderir e invadir as células do hospedeiro (Figura 2) (NEWTON et al., 1991a; 1991b; YONEKURA; MAKI-YONEKURA; NAMBA, 2002; RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004; MURTHY et al., 2004; CUNNINGHAM et al., 2004). Dependendo da espécie bacteriana, a flagelina pode ter massa molecular que varia de 28 a 80 kDa, mas o alinhamento das seqüências de aminoácidos de diferentes flagelinas revelou que existe conservação de resíduos de aminoácidos localizados nas regiões N- e C- terminais. Por outro lado, a região central da molécula, apresenta-se altamente hipervariável tanto na composição de resíduos de aminoácidos quanto na extensão. Além disso, por meio do mecanismo de variação de fase, uma mesma espécie pode produzir diferentes tipos de flagelinas (WEI; JOYS, 1985; NEWTON; JACOB; STOCKER, 1989; YONEKURA; MAKI-YONEKURA; NAMBA, 2003; RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004).

A estrutura terciária da flagelina, formada pelo pareamento das regiões N- e C- terminais da molécula, assemelha-se a um "*boomerang*", sendo definidos quatro domínios: Os domínios D0 e D1, constituídos de estrutura alfa-hélice, são dispostos no centro do filamento flagelar; e os domínios D2 e D3, constituídos de folhas β-pregueada, são formados pela região central hipervariável e expostos na superfície do filamento flagelar **(**Figura 2**).** Os domínios D0 e D1 são indispensáveis para polimerização da flagelina e a conservação destes resíduos é um ponto chave para a montagem do filamento bacteriano e função de mobilidade. Por outro lado, a

região central hipervariável é rica em epítopos B e utilizada para distinção de bactérias baseada na sorotipagem do antígeno H (FLYNN et al., 1990; YONEKURA; MAKI-YONEKURA; NAMBA, 2003; RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004; MURTHY et al., 2004).

Em adição ao seu papel como constituinte do flagelo bacteriano, flagelinas, principalmente aquelas produzidas por Salmonelas, são reconhecidas como potentes indutores de resposta imunológica e por isso, utilizadas como adjuvante vacinal (MURTHY et al., 2004; CUNNINGHAM et al., 2004). Os mecanismos pelos quais a flagelina estimula o sistema imunológico são amplamente estudados e ocorrem, principalmente, pela ativação do receptor *"Toll-like receptor 5*" (TLR5) encontrado na superfície de monócitos, macrófagos, células dendríticas (DCs) e células epiteliais (Figura 3). A interação da flagelina com o TLR5 leva ao recrutamento de proteínas adaptadoras, incluindo o fator de diferenciação mielóide (MyD88), e à ativação/translocação do fator nuclear de transcrição (NF-κB) para o núcleo da célula, onde este promove a expressão de vários genes. Dentre os genes-alvo de NF-κB estão os genes de citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF-α, IFN-ɣ), de moléculas de adesão (ICAM, VCAM) e de enzimas induzíveis (iNOS e COX-2) (ZHANG; GHOSH, 2001; HONKO; MIZEL, 2005; APPLEQUIST et al., 2005). Além disso, a estimulação de TLR5 na superfície de DCs promove sua ativação e maturação, o que inclui aumento da expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC-I e MHC-II) e moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86 e CD40), bem como secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, o que torna essas células aptas para sensibilização de células T virgens (MCSORLEY; COOKSON; JENKINS, 2000; MCSORLEY; JENKINS, 2000; KAISHO; AKIRA, 2002; MCSORLEY et al., 2002; TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003; AKIRA; YAMAMOTO; TAKEDA, 2003; AKIRA; TAKEDA, 2004; CUADROS et al., 2004; PINO; MARTIN; MICHALEK, 2005; RAVINDRAN; MCSORLEY, 2005; HONKO; MIZEL, 2005; HONKO et al., 2006).

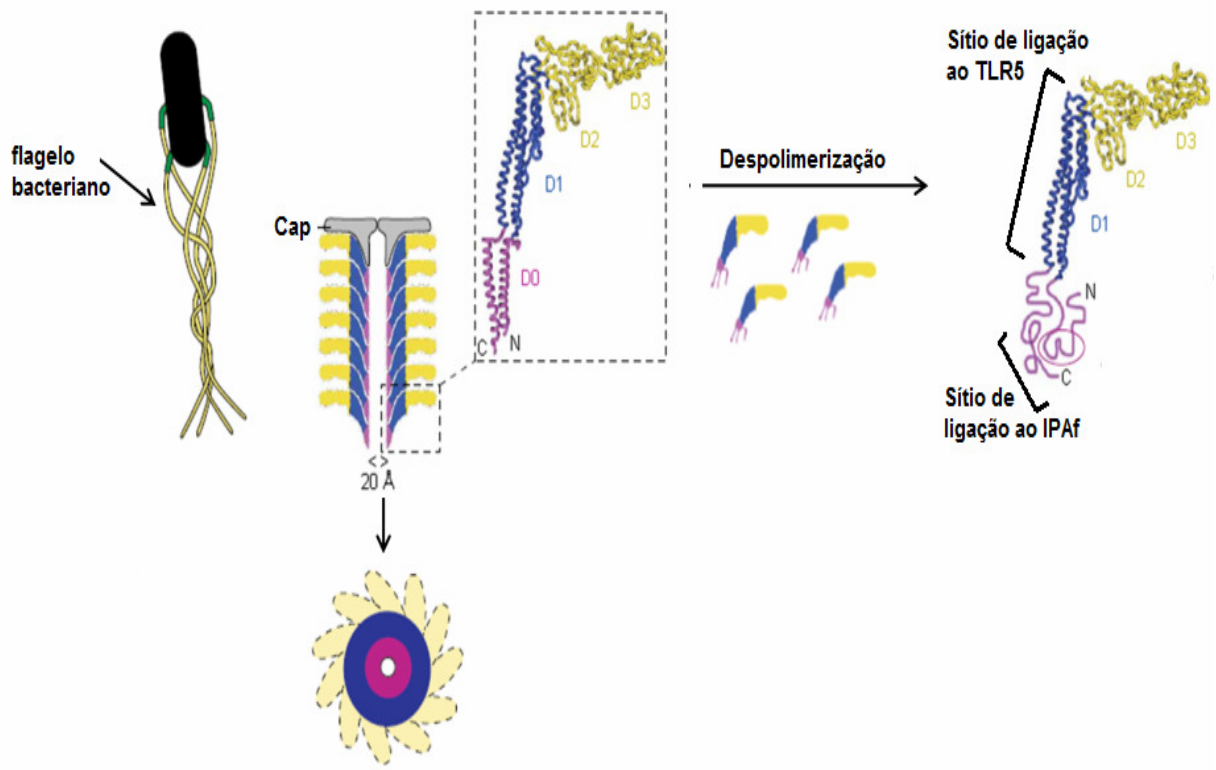


Figura 2 - Estrutura e organização da flagelina no flagelo. O flagelo é uma haste longa e flexível formada pelo corpo basal (responsável por seu ancoramento à parede celular bacteriana), o gancho (verde) e o filamento flagelar (amarelo). Os esquemas tranversal e longitudinal monstram como a flagelina é polimerizada para formar o filamento flagelar. Em destaque são apresentados os domínios da flagelina nas cores: púrpura (domínio D0) e azul (domínio D1) que representam as regiões conservadas da molécula, e em amarelo os domínios D2 e D3, que representam a porção hipervariável da molécula. Após a despolimeração o monômero de flagelina expõe os sítios de ligação aos receptores TLR5 (domínio D1) e IPAF/Naip5 (35 aa da região C-terminal, domínio D0).
Fonte: Modificado de Ramos, Rumbo, Sirard (2004).

Além disso, é importante destacar que a flagelina também é reconhecida por um complexo de receptores IPAF/Naip5 pertencente à família de receptores do tipo NOD "NOD-like receptors" (MIAO et al., 2007; LIGHTFIELD et al., 2008). Esses receptores formam complexos chamados inflamassomas e, ao contrário do TLR5 que responde a flagelina extracelular, IPAF/Naip5 responde a flagelina localizada no citoplasma das células (Figura 3). Além disso, a ligação da flagelina ao complexo IPAF/Naip5 leva à secreção das citocinas IL-1β, IL-18 e ativação da cisteína protease caspase-1, que leva a morte celular por piroptose. A piropitose compartilha algumas características com a apoptose e a necrose, logo, é um tipo de morte

celular programada dependente da atividade de sinalização dentro da célula, mas que resulta em perda de integridade de membrana e liberação do conteúdo citoplasmático no espaço extracelular, um evento altamente inflamatório. Embora a ligação de flagelina ao IPAF/Naip5 desencadeie resposta inflamatória, a contribuição desta via de sinalização para seu efeito adjuvante permanece indeterminada, sendo estudada principalmente para compreensão dos mecanismos de patogenicidade de bactérias intracelulares flageladas como *Salmonella sp.*, *Legionella pneumophila* e *Listeria monocitogenes* (MIAO et al., 2007; LIGHTFIELD et al., 2008).

Recentemente foram mapeados na flagelina os resíduos de aminoácidos que participam da interação com o TLR5 e IPAF/Naip5, verificando-se que estes se encontram nos domínios D1 e D0, respectivamente (ANDERSEN-NISSEN et al., 2007; LIGHTFIELD et al., 2008). No entanto, esses domínios ficam escondidos no filamento flagelar, sendo necessário que a flagelina se encontre na forma monomérica para interação com TLR5 ou IPAF/Naip5, o que geralmente ocorre após liberação de flagelina monomérica por ruptura mecânica do flagelo em superfícies de mucosas ou ainda por inoculação acidental no citoplasma da célula via sistema de secreção do tipo III (SUN; ROLAN; TSOLIS, 2007; MIAO et al., 2007). Na forma monomérica o domínio D1 ainda apresenta estrutura em alfa-hélice, e esta conformação é indispensável para o reconhecimento pelo TLR5. Por outro lado, o domínio D0 apresenta-se sem estrutura, e seu reconhecimento por receptores NOD-like se dá por meio da ligação aos últimos trinta e cinco resíduos de aminoácidos da região C-terminal (LIGHTFIELD et al., 2008). É notável que o sistema imunológico tenha elaborado dois distintos mecanismos para o reconhecimento do mesmo produto microbiano, o que sugere que a flagelina funciona como um potente sinal de alerta capaz de ativar respostas imunológicas complexas. Além disso, a detecção de porções distintas da molécula, mas essenciais para função flagelar, fornece um meio pelo qual o sistema imunológico limita o escape do patógeno.

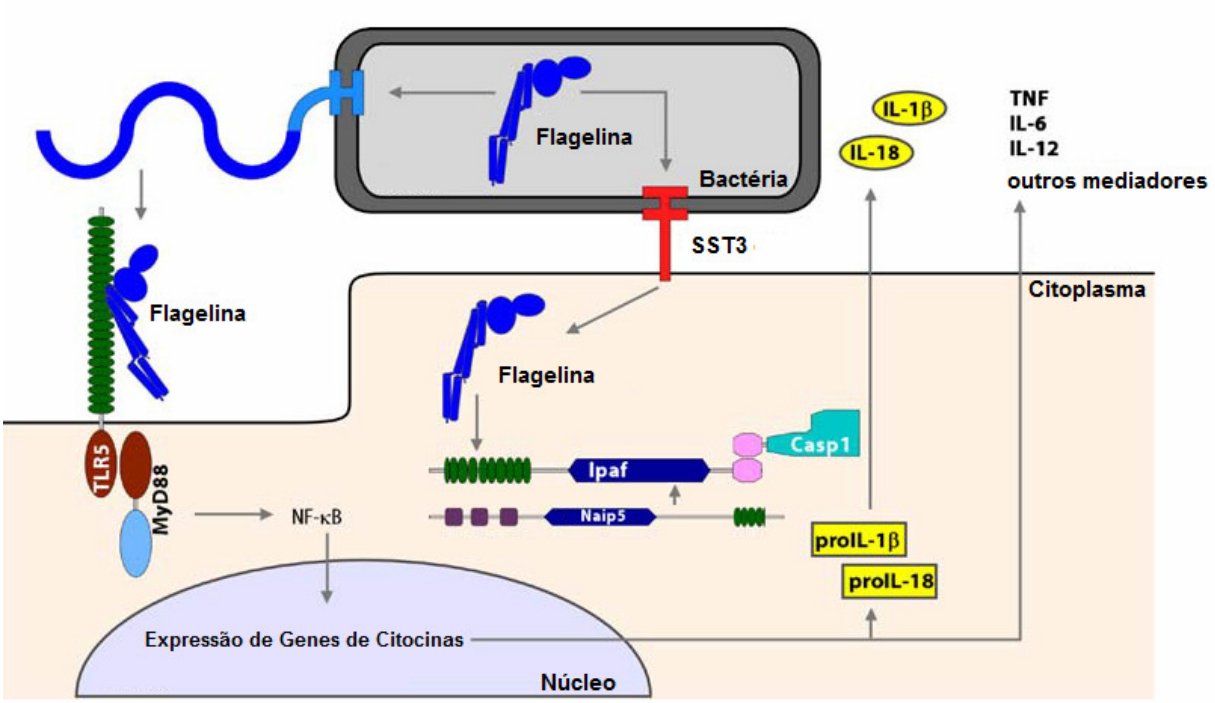


Figura 3 – Sinalização celular mediada por flagelina. TLR5 detecta monômeros de flagelina extracelular e ativa a cascata de sinalização dependente de MyD88, o que resulta na expressão de citocinas pró-inflamatórias. IPAF/Naip5 respondem à flagelina localizada no citoplasma da célula e levam a ativação de capase-1. IL-1β e IL-18 são duas citocinas que requerem dois estímulos para que sejam secretadas. TLR5 ou outros TLRs estimulam a expressão de pró-IL-1β e pró-IL-18, que são retidas no citoplasma. IPAF/Naip5 ativam caspase-1, que faz o processamento proteolítico de pró-IL-1β pró-IL-18, promovendo a secreção das citocinas na forma ativa.
Fonte: Modificado de Miao et al. (2007).

Devido suas características imunoestimuladoras intrínsicas, diferentes tipos de flagelinas derivadas de *Salmonella sp.* (FliC*d*, FliC*i*, FljB) foram utilizadas como adjuvante em formulações vacinais destinadas para ativação de resposta humoral e celular. As primeiras abordagens utilizando flagelinas de *Salmonella* iniciaram com o grupo do Dr. Bruce Stocker em 1989 (NEWTON; JACOB; STOCKER, 1989). A estratégia proposta inicialmente consistia na clonagem de oligonucleotídeos sintéticos codificando epítopos para ativação de linfócitos B, T $CD4^+$ ou T $CD8^+$, na região central hipervariável do gene responsável pela codificação da flagelina, e posterior expressão do flagelo híbrido por linhagens atenuadas de Salmonelas que eram administradas pela via intraperitoneal. A primeira experiência utilizando o sistema *Salmonella*-flagelina para apresentação de antígenos heterólogos foi realizada para expressão do epítopo CTP-3 derivado da subunidade B da toxina

colérica (CT). Após imunização parenteral com *Salmonella* vacinal codificando flagelo híbrido, os camundongos desenvolveram altos títulos de anticorpos capazes de reconhecer a toxina na forma nativa (NEWTON; JACOB; STOCKER, 1989). Esses resultados despertaram o interesse de alguns grupos de pesquisa que utilizaram a mesma abordagem em formulações vacinais para obtenção de resposta imunológica humoral e celular frente a diferentes antígenos (NEWTON et al., 1991a, 1991b, 1995; VERMA et al., 1995; MIZEL et al., 2003; MURTHY et al., 2004).

Modificações da proposta inicial de utilizar linhagens de *Salmonella* como carregadoras de antígenos heterólogos em fusão à flagelina, incluem a utilização de flagelinas purificadas. A descoberta do papel dos receptores TLRs na ativação de células da imunidade inata e da contribuição destas para o desenvolvimento de efetiva resposta adaptativa foram os responsáveis pela crescente utilização de flagelinas purificadas. Além disso, a flagelina agrega inúmeras vantagens não encontradas em outros agonistas de TLRs ou mesmo em adjuvantes atualmente avaliados em ensaios pré-clínicos e clínicos.

Recentemente algumas das vantagens da utilização flagelina de *S.* Typhimurium como adjuvante foram comprovadas em ensaios pré-clínicos e clínicos para vacinas de subunidades anti-influenza. Dentre estas vantagens estão: (i) efetividade em baixas doses (1-10 µg), como demonstrado em ensaios com camundongos, primatas não-humano e humanos; (ii) efetividade em idosos; (iii) ausência de resposta de IgE; (iv) ausência de efeitos adversos em animais (camundongo e coelho até 100 µg/dose) e em humanos (quando utilizada abaixo de 8 µg/dose); (v) o efeito adjuvante não é comprometido por imunidade humoral pré-existente; (vi) flagelina é uma molécula versátil, e pode ser administrada pela mistura com o antígeno de interesse ou na forma de proteína híbrida; onde sequências codificando epítopos ou mesmo proteínas inteiras são geneticamente fusionadas em várias partes da molécula sem comprometimento da ativação TLR5-dependente; (vii) facilidade de produção em larga escala e em condições GMP; (viii) administração por via parenteral e de mucosas (exceto a via oral uma vez que a flagelina monomérica é degradada) (JEON; BEN-YEDIDIA; ARNON, 2002; HULEATT et al., 2008; SONG et al., 2009; TREANOR et al., 2010; TURLEY et al., 2011). Além disso, flagelina pode ser incoporada em sistemas de entrega tais como nanopartículas (SALMAN; IRACHE; GAMAZO, 2009), lipossomas (FAHAM; ALTIN,

2010), VLPs (WANG et al., 2008), vacinas de DNA (APPLEQUIST et al., 2005), ou administrada com vacinas de primeira geração (SKOUNTZOU et al., 2009).

O primeiro trabalho que utilizou flagelina purificada como adjuvante vacinal foi realizado pelo grupo da Dra. Ruth Arnon (MCEWEN et al., 1992), onde foi demonstrado que flagelina híbrida purificada, fusionada geneticamente ao antígeno do vírus influenza, promoveu forte resposta de anticorpos na ausência de qualquer outro adjuvante. Em seguida, vários estudos foram publicados utilizando a fusão de epítopos ou proteínas inteiras a flagelinas de *Salmonella* (LUNA et al., 1997; BEN-YEDIDIA et al., 1999a, 1999b; JEON; BEN-YEDIDIA; ARNON, 2002; CUADROS et al., 2004; HULEATT et al., 2007; MIZEL et al., 2009; BARGIERI et al., 2008, 2010) ou mesmo de outras bactérias (LEE et al., 2006) como adjuvante vacinal. Entretanto, existe grande controvérsia na literatura sobre a utilização de flagelinas híbridas, e enquanto alguns autores sugerem que a ligação física do antígeno não é um fator imprescindível para o efeito adjuvante da flagelina (MCSORLEY et al., 2002; DIDIERLAURENT et al., 2004; APPLEQUIST et al., 2005; LEE et al., 2006; HONKO et al., 2006) outros apontam a necessidade de fusão como pré-requisito para sua adjuvanticidade (HULEATT et al., 2007; BATES et al., 2011).

O emprego de flagelina como adjuvante vacinal para ativação de resposta humoral é vasto e foi recentemente revisado por Bates et al. (2011). No entanto, seu uso como adjuvante capaz de ativar imunidade mediada por células T $CD4^+$ (MCSORLEY et al., 2002; BRAGA et al., 2009) e, principalmente por células T $CD8^+$ (CUADROS et al., 2004; HULEATT et al., 2007; BRAGA et al., 2010) é bastante reduzido e permeado por resultados conflitantes, onde em um dado modelo flagelina apresenta substancial efeito adjuvante para células T $CD8^+$ (CUADROS et al., 2004; HULEATT et al., 2007; BRAGA et al., 2010); enquanto em outros modelos não (SCHWARZ et al., 2003; DIDIERLAURENT et al., 2004). Além disso, o trabalho recentemente publicado pelo grupo do Dr. Mizel demonstrou que a flagelina promoveu ativação e proliferação de células T $CD8^+$ OVA-específica independente da via TLR5, embora o exato mecanismo não esteja completamente elucidado (BATES et al., 2011).

Nos últimos cinco anos, a flagelina revelou-se um adjuvante complexo cujos efeitos não refletem apenas a ativação dos receptores TLR5 ou IPAF/Naip5, mas mantém estreita relação com a natureza do antígeno, a forma como a flagelina é administrada, a via de administração e também o modelo estudado. Apesar de todas

as características que fazem da flagelina um adjuvante ideal para uso em humanos e também para outras aplicações médicas (como radioimunoprotetor), sua utilização deve ser acompanhada de intensa pesquisa que permita compreender a complexidade das respostas imunológicas que esta molécula desencadeia, principalmente para o controle de patógenos intracelulares e cânceres onde a ativação de células T $CD8^+$ é requerida.

1.3 Modelos de antígenos utilizados

As vacinas disponíveis até o momento são de aplicação profilática, mas existe uma grande necessidade de pesquisas direcionadas para elaboração de abordagens terapêuticas. As vacinas terapêuticas funcionam como substitutos ou auxiliares de terapias já existentes e representam uma alternativa de suporte imunológico para o tratamento de doenças infecciosas crônicas e algumas formas de câncer. A principal característica deste tipo de abordagem é a geração de linfócitos T citotóxicos responsáveis pela destruição de células infectadas ou transformadas. Enquanto anticorpos exercem papel chave na neutralização do patógeno, os linfócitos T $CD8^+$ citotóxicos podem destruir células infectadas e impedir a progressão da doença (AUTRAN et al., 2004a, 2004b). Neste trabalho utilizamos os antígenos p24 do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1); E7 do vírus do papiloma humano (HPV-16); CS do *Plasmodium yoelli* e gp43 do *Paracoccidioides brasilienses* como modelos para estudar o potencial adjuvante de flagelinas de *Salmonella sp.* para ativação de respostas celulares. A escolha destes antígenos foi fundamentada na importância da resposta celular antígeno-específica e proteção contra estas patologias. De um modo geral, complicações destas doenças surgem como resultado de resposta imune celular inadequada para a eliminação de patógenos intracelulares ou pela indução de tolerância imunológica.

1.3.1 Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e o HIV

O HIV é um vírus envelopado com genoma constituído por duas fitas simples de RNA (extensão de 9.800 pares de bases) que codificam três genes essenciais para a replicação e estrutura viral (*gag*, *env*, *pol*) e outros seis genes acessórios com funções reguladoras, sobretudo do ciclo reprodutivo. O gene *gag* codifica as

proteínas estruturais do capsídeo viral; o gene *env* codifica as glicoproteínas (gp120 e gp41) do envelop, as quais são fundamentais para a adesão viral e entrada do vírus na célula hospedeira; e o gene *pol* codifica as proteínas não-estruturais necessárias à replicação do vírus, incluindo as enzimas transcriptase reversa (RT), protease (PR) e integrase (IN). O gene *gag* codifica uma poliproteína Gag de 55kDa que é proteoliticamente clivada durante a maturação do vírus originando as proteínas da matriz (p17), do capsídeo (p24), do nucleocapsídeo (p7/p9) e outros produtos de baixo peso molecular (p1, p2 e p6). Além desses, outros genes codificados pelo HIV são *vif* (que codifica um fator de infectividade do vírus), *vpr* (que codifica proteínas virais), *tat* (que codifica um transativador), *rev* (que codifica um regulador da expressão das proteínas do vírus), *nef* (que codifica o fator regulador negativo) e *vpu* (que codifica a proteína viral U). Destes genes, três (*tat*, *rev* e *nef*) codificam proteínas reguladoras que controlam a expressão dos genes estruturais *gag*, *env* e *pol* (SLEASMAN; GOODENOW, 2003).

Estima-se que mais de 40 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas com o HIV. A introdução de uma política de acesso universal ao tratamento anti-retroviral fez com que as taxas de mortalidade diminuíssem e estabilizassem, mas novos casos da infecção continuam a surgir e, associado ao número de indivíduos já infectados e que não respondem aos esquemas terapêuticos atuais, apontam para a necessidade de intervenções mais efetivas.

Nos últimos 20 anos, pesquisas voltadas para o desenvolvimento de uma vacina contra a AIDS demonstraram que a proteção contra a doença depende da ativação de respostas celulares específicas responsáveis pela destruição de células infectadas pelo vírus e não apenas da produção de anticorpos neutralizantes direcionados a proteínas do envoltório viral. As estratégias para desenvolver uma vacina terapêutica contra HIV/AIDS são direcionadas a epítopos virais, particularmente abundantes em algumas proteínas como a Gag, Nef e Pol (GAHERY-SEGARD et al., 2003; BOLESTA et al., 2005). De um modo geral estas formulações buscam a ativação de respostas celulares, especialmente de linfócitos T $CD8^+$ devido o reconhecido papel destas células no controle da carga viral (OGG et al., 1998). Porém, a estimulação de células T $CD4^+$ também deve ser abordada uma vez que esta população celular é fundamental para o desenvolvimento de CTLs e manutenção de células T $CD8^+$ de memória. De fato, durante a infecção natural pelo HIV-1, a indução de respostas mediadas por células T $CD8^+$ tem correlação direta

com a diminuição da carga viral (BORROW et al., 1994). Além disso, o papel protetor mediado por linfócitos T $CD8^+$ foi estabelecido a partir de estudos feitos em símios desafiados com o SIV (vírus da imunodeficiência em símios) (BORROW et al., 1994; MCMICHAEL, 2006). Dados recentes sugerem que a proteína Gag(p24) é uma forte candidata à construção de uma vacina terapêutica anti-HIV, uma vez que a presença de células $CD8^+$ p24-específicas têm correlação inversa com a progressão da doença (ROSENBERG et al., 1997; OGG et al., 1998). Desse modo, o antígeno p24 foi escolhido para avaliação do potencial adjuvante de flagelina de *Salmonella* no contexto da ativação de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$.

1.3.2 Câncer cervical e o HPV

HPV é um vírus não envelopado com genoma consituído por dupla fita de DNA circular (extensão de 8.000 pares de bases) que codifica dois genes de expressão tardia *L1* e *L2* (L, do inglês *late*), e seis genes de expressão precoce *E1, E2, E4, E5, E6* e *E7* (E, do inglês "*early*"). Os genes *L1* e *L2* codificam as proteínas estruturais do capsídeo viral L1 e L2; enquanto os genes *E1-7* cofificam as proteínas E1-7, as quais exercem papel na regulação do ciclo viral, controlando a replicação do DNA viral (E1 e E2), transcrição de RNA viral (E2), montagem das partículas virais (E4) e o ciclo celular (E5, E6 e E7).

O HPV está associado com cerca de 99% dos casos de câncer cervical, com destaque para o HPV-16, como tipo viral de alto risco para o desenvolvimento de câncer de colo de útero. Embora campanhas de prevenção, como o exame Papanicolau, sejam amplamente adotadas, novos casos de câncer cervical continuam surgindo, sendo este a segunda maior causa de morte por câncer entre mulheres de todo o mundo porque muitas não têm acesso a esta medida preventiva. O recente lançamento de uma vacina profilática contra o HPV deve reduzir o impacto da doença em longo prazo, no entanto os benefícios para as pessoas já infectadas pelo vírus são nulos, uma vez que a infecção por HPV geralmente acontece nas primeiras duas décadas da vida do indivíduo, mas o câncer cervical pode se manisfestar apenas vinte a trinta anos depois (BROWN et al., 2005).

O vírus HPV é capaz de infectar camadas basais do epitélio através de microlesões no tecido, mas o processo de malignização do tecido depende da integração do vírus ao genoma da célula hospedeira após quebra do genoma viral e

perda de alguns genes, principalmente E2. E2 tem a função de regular negativamente a expressão das oncoproteínas E6 e E7 e sua perda ocasiona a expressão contitutiva de E6/E7 (HOWLEY, 1991; MCCANCE, 1998; MCMURRAY et al., 2001). As proteínas E6 e E7 atuam na malignização celular através da interação com um vasto repertório de proteínas, promovendo bloqueio de apoptose, proliferação celular e instabilidade cromossômica. Especificamente E7, interage com a proteína retinoblastoma (pRb) liberando o fator de transcrição E2F, que ativa genes envolvidos na síntese de DNA e progressão do ciclo celular (DYSON et al., 1989; WERNESS; LEVINE; HOWLEY, 1990). E7 também pode promover proliferação celular através de interação com fatores de transcrição AP-1 (NEAD et al., 1998) e expressão de ciclina A e ciclina E (ZERFASS et al., 1995).

Mais de 120 tipos de HPV foram descritos e cerca de 40 apresentam tropismo para infectar a mucosa do trato anogenital (BOSCH et al., 1995; PAAVONEN, 2007). Os vírus com este tropismo podem ser classificados como “baixo” ou “alto risco” de acordo com seu potencial oncogênico. Os genótipos de baixo risco podem causar verrugas genitais e lesões benignas, sendo os mais prevalentes, os HPV-6 e HPV-11 (DE VILLIERS et al., 2004). Os genótipos do HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 e HPV-45 são os mais freqüentemente associados a lesões de alto grau e tumores malignos, pertencendo ao grupo dos genótipos de alto risco (MUNOZ et al., 2003). Os HPV-16 e HPV-18 destacam-se por serem responsáveis por cerca de 70% dos casos de câncer do colo do útero, sendo que o HPV-16 sozinho causa cerca de 55% dos casos deste tipo de câncer, podendo ser considerado o principal agente etiológico da doença (BOSCH et al., 1995).

As proteínas estruturais L1 e L2 formam o capsídeo viral e têm sido utilizadas como alvos para o desenvolvimento de vacinas profiláticas, sendo recentemente lançadas duas vacinas baseadas em VLPs constituídas por proteínas L1 do HPV-6, -11, -16 e 18 (Gardasil) ou L1 do HPV-16 e 18 (Cervarix) (HARPER et al., 2004, 2006; GARLAND et al., 2007). Por outro lado, as oncoproteínas E6 e E7 são utilizadas em diferentes abordagens terapêuticas, uma vez que a expressão constitutiva destas proteínas em células do carcinoma cervical e a participação na manutenção do estado maligno as tornam alvos ideais para intervenção terapêutica de tumores associadas ao HPV (DOEBERITZ et al., 1994).

Diferentes tipos de vacinas foram testadas para indução de resposta imune celular anti-tumor induzido por HPV-16, e a maioria dos estudos utilizou como

antígeno principal a proteína E7 e em menor extensão as proteínas E6, E5 e/ou E2 (LASARO; ERTL, 2009). As abordagens terapêuticas incluem formulações baseadas em peptídeos (FELTKAMP et al., 1993) ou na proteína E7 administrada com adjuvantes tais como citocinas, tais como a IL-12 (HARIHARAN et al., 1998; AHN et al., 2003), a fusão do antígeno protéico com proteínas de choque térmico (hsp 65) (CHU et al., 2000); vacinas de DNA (HUNG et al., 2001) e vetores virais baseados em adenovírus recombinantes (HE et al., 2000), vetores bacterianos vivos baseados em *L. monocitogenes* (GUNN et al., 2001) ou *Lactococcus lactis* recombinantes (BERMUDEZ-HUMARAN et al., 2003) e células dendríticas pulsadas com peptídeos imunodominantes da oncoproteína E7 (OKADA et al., 1997).

As proteínas E6 e E7 contêm regiões antigênicas apresentadas por moléculas de MHC/HLA classe I e II tanto em camundongos como em humanos (KANODIA, 2008). As respostas imunes envolvidas na erradicação de células tumorais são essencialmente mediadas por células T $CD8^+$. No entanto, uma atividade efetiva e sustentada de linfócitos T $CD8^+$ pode ser estimulada por colaboração de células T $CD4^+$ Th1. A indução de uma resposta citotóxica eficiente e a superação dos mecanismos de tolerância induzidos pelas proteínas E6 e E7 está entre os principais desafios encontrados para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra tumores induzidos por HPV. Devido à importância para o controle de tumores induzidos por HPV, E7 foi escolhida como antígeno modelo para a avaliação do potencial adjuvante de flagelina de *Salmonella* no contexto da ativação de linfóticos T $CD8^+$.

1.3.3 Paracoccidioidomicose (PCM) e o P. brasiliensis

A PCM é uma micose sistêmica de natureza granulomatosa e evolução crônica causada pelo fungo termodimórfico *P. brasiliensis* (Pb) (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; RESTREPO; MCEWEN; CASTANEDA, 2001; SAN-BLAS; NINO-VEJA; ITURRIAGA, 2002). A prevalência da doença é delimitada aos países da América latina, sendo que a maioria dos casos ocorre no Brasil, Venezuela, Colômbia, Equador e Argentina. No Brasil, a maior incidência da doença ocorre em áreas rurais dos estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás, Rio de Janeiro e Rondônia (AMEEN; TALHARI; TALHARI, 2010; COLOMBO et al., 2011). Acredita-se que aproximadamente 10 milhões de pessoas que vivem

em áreas endêmicas podem ter adquirido o fungo e dessas (BRUMMER et al., 1993; BORGES-WALMSLEY et al., 2002). A infecção por Pb geralmente acontece nas primeiras duas décadas da vida do indivíduo, mas a doença pode se manisfestar após o período de latência de cerca de quinze anos (COLOMBO et al., 2011; AMEEN; TALHARI; TALHARI, 2010).

O ciclo da PCM inicia-se quando conídios ou propágulos produzidos por micélios saprófitas no meio ambiente são inalados e instalam-se nos pulmões onde formam um granuloma primário, a partir do qual podem disseminar-se para órgãos como o baço e o fígado. Esse complexo primário pode evoluir para a cura, tornar-se latente ou ainda progredir causando uma doença severa e disseminada (SAN-BLAS; NINO-VEJA; ITURRIAGA, 2002; MENDES-GIANNINI et al., 2008).

A PCM tem múltiplas apresentações clínicas, com manifestações que podem variar de cutâneas a sistêmicas sendo classificada, para fins de diagnóstico, em duas formas clínicas bem distintas: aguda e crônica. A forma aguda da PCM representa 5% dos casos da doença e acomete indivíduos jovens. Essa forma é caracterizada por evolução rápida, baixa resposta imune celular e aumento na produção de anticorpos específicos. A forma crônica representa a forma mais grave da doença, onde se destacam mais de 90% dos casos, sendo observada principalmente em adultos do sexo masculino. Nessa fase a doença progride lentamente, com a presença do patógeno nas lesões, títulos elevados de anticorpos específicos e comprometimento da imunidade mediada por células. Nesses casos, 90% dos indivíduos apresentam manifestações pulmonares sendo que em apenas 25% dos indivíduos infectados a lesão permanece localizada no pulmão (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; BERNARD, 2008).

O tratamento medicamentoso da PCM é realizado a base de sulfametoxazol/trimetoprim, anfotericina B e derivados azólicos. Por ser uma doença crônica, seu tratamento é prolongado provocando complicações em vários órgãos em função dos efeitos adversos da terapia (AMEEN; TALHARI; TALHARI, 2010). O desenvolvimento de vacinas com potencial para estimular respostas imunológicas protetoras em pacientes crônicos representa uma melhoria na qualidade de vida desses indivíduos e podem ser utilizadas em abordagens profiláticas, terapêuticas ou ainda em associação com antifúngicos.

O controle da infecção depende de resposta imune celular efetiva, geralmente associada ao padrão tipo 1 (Th1) da resposta imunológica, caracterizado

pela síntese de citocinas que ativam macrófagos e linfócitos T $CD4^+$, resultando na formação de granulomas compactos. Indivíduos infectados e com a forma grave da doença param de apresentar resposta do tipo Th1 evoluindo com a resposta do tipo Th2 onde ocorre ativação de linfócitos B e produção de altos títulos de anticorpos (CANO et al., 1995; CALICH; KASHINO, 1998; CANO et al., 1998; ARRUDA et al., 2002).

Nos últimos anos, pesquisas voltadas para o desenvolvimento de uma vacina contra a PCM demonstraram que uma pequena seqüência de 15 aminoácidos, denominada P10, pertencente a glicoproteína de 43 kDa (gp43), define um epítopo específico para células T $CD4^+$ (TABORDA et al., 1998). Além disso, camundongos imunizados via parenteral com P10 em combinação com adjuvante completo de Freund (CFA) controlaram parcialmente a proliferação do Pb após desafio intratraqueal, e além disso, esses animais desenvolveram infecção 200 vezes menos intensa que os animais não imunizados. Ao analisar a sub-população de linfócitos T $CD4^+$ envolvidos, constatou-se que as células presentes eram do tipo Th1 e produtoras de IL-12 e IFN-ɣ. Em 2006 o grupo demonstrou ainda que a formulação P10/CFA empregado em associação a drogas antifúngicas de uso clínico, apresentou efeito aditivo levando à maior redução da carga fúngica nos animais infectados com Pb. A proteção mediada por P10 foi reproduzida em um modelo de recidiva da doença onde o tratamento com P10 em associação aos antifúngicos sulfametoxazol/trimetoprim impediu a exacerbação da infecção (MARQUES et al., 2006). A associação do P10/CFA com drogas antifúngicas também mostrou-se efetiva na redução da carga fúngica e na reativação do sistema imune celular em camundongos previamente tratados com dexametasona para mimetizar o estado anérgico ligado à forma aguda da PCM (MARQUES et al., 2008). No entanto, a administração do peptídeo P10 em combinação ao adjuvante de Freund inviabiliza a aplicação dessa formulação em seres humanos em função da elevada toxicidade do adjuvante.

Diante do exposto, os antígenos gp43 e P10 foram selecionados como antígenos-modelo para avaliação do potencial adjuvante de flagelinas de *Salmonella* no contexto da ativação de resposta imunológica, particularmente mediada por linfócitos T $CD4^+$.

1.2.4 Malária e o P. yoelli

A malária é uma doença crônica severa distribuída mundialmente. Em humanos, é causada por um dos quatro parasitas: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, sendo que este último não é encontrado no Brasil. Cerca de 40% da população mundial (2,4 bilhões de pessoas) está exposta à malária, especialmente pessoas que vivem em países tropicais e subtropicais. Nestas regiões, aproximadamente 300 a 500 milhões de novos casos são diagnosticados a cada ano, causando 1,5 a 2,7 milhões de mortes por ano, principalmente entre crianças na África (WHO, 2002). No Brasil, desde a década de 70, quando apenas 52.000 casos foram registrados, a incidência da doença aumentou gradualmente. Nos anos de 1999 e 2000 verificamos os maiores picos de incidência da doença, ultrapassando a faixa de 600.000 novos casos/ano, sendo 99% oriundos da região Amazônica. No ano de 2009 foram registrados quase 307 mil casos/ano em todo o Brasil, sendo esta a menor incidência da doença observada em um período de no mínimo 20 anos (BRASIL, 2011; JONES; HOFFMAN, 1994).

A ineficácia das estratégias de controle e tratamento da malária tem contribuído para o aumento da incidência da doença no mundo, e reforçam a necessidade de desenvolvimento de uma vacina terapêutica. Porém vários fatores impedem o desenvolvimento de uma vacina segura para a malária, dentre eles a complexidade do ciclo de vida do parasito e a ampla variedade de respostas imunológicas que devem ser induzidas (WATERS et al., 2005).

Estudos pioneiros realizados pelo grupo do Dr. Nussenzweig, demonstraram que imunidade protetora contra a malária pode ser induzida em animais e humanos por imunização com esporozoítas atenuados por radiação gama (NUSSENZWEIG; NUSSENZWEIG, 1986). Os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta protetora foram a produção de anticorpos e ativação de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ específicos para antígenos da superfície de esporozoítas (NUSSENZWEIG; NUSSENZWEIG, 1989; JONES; HOFFMAN, 1994). Desse modo, formas sanguíneas podem ser eliminadas pela ligação a anticorpos opsonizantes dirigidos para estruturas da superfície do patógeno, enquanto as formas intracelulares do parasita podem ser eliminadas por linfócitos T citotóxicos. Estas células são capazes de reconhecer epítopos derivados do parasita que são expressos por células infectadas em associação a moléculas MHC-I e promover a destruição dessas

células, impedindo a continuidade do ciclo celular do parasita (KAPPE; BUSCAGLIA; NUSSENZWEIG, 2004).

O papel de linfócitos T $CD8^+$ citotóxicos na imunidade à malária foi reforçado pela demonstração de que a transferência passiva de células T $CD8^+$ CS-específicas para camundongos virgens foi capaz de protegê-los contra o desafio com *P. berghei* e *P. yoelii,* agentes da malária em murinos (RODRIGUES et al., 1991; TSUJI; ZAVALA, 2003). Assim, o desenvolvimento de imunidade mediada por células T citotóxicas representa prioridade para o desenvolvimento de uma vacina com propriedades profiláticas e terapêuticas contra a malária.

Pesquisas de alvos antigênicos para vacinas contra a malária com potencial para ativação de linfócitos T $CD8^+$ citotóxicos voltaram-se para uma proteína de superfície com estrutura primária definida, a proteína circunsporozoíta (CS). Esta proteína é encontrada em grande quantidade na superfície de esporozoítos de todas as espécies de *Plasmodium* e possui papel central na invasão de hepatócitos (KAPPE; BUSCAGLIA; NUSSENZWEIG, 2004). Linfócitos T $CD8^+$ extraídos de camundongos imunizados com esporozoítas atenuados por radiação foram específicos para um único epítopo encontrado na região C- terminal da proteína CS de *P. yoelii* e *P. berghei* (ROMERO et al., 1989; RODRIGUES et al., 1991). Este epítopo, representado pela seqüência de aminoácidos SYVPSAEQI, é reconhecido por linfócitos T $CD8^+$ restritos para o MHC H-2 K^d e seu papel na proteção à malária murina foi confirmado em diversos estudos, o que impulsionou o desenvolvimento de vacinas baseadas no antígeno CS (WEISS et al., 1988; ROMERO et al., 1989; GONZALEZ-ASEGUINOLAZA et al., 2003). Em voluntários imunizados com esporozoítas de *P. falciparum,* atenuados por radiação, foi demonstrado a presença de linfócitos T $CD8^+$ CS-reativos, indicando que a proteína CS é uma forte candidata para a elaboração de vacinas contra a malária em humanos.

Diferentes veículos vacinais foram empregados na ativação de células T $CD8^+$ específicas para o epitopo da proteína CS em camundongos. Tais abordagens incluiram vetores vacinais vivos, como vírus e bactérias recombinantes, vacinas de DNA, partículas semelhantes a vírus (VLP) e peptídeos sintéticos. Os vetores virais utilizados para ativar células T $CD8^+$ específicas ao epitopo CS, de um modo geral, conferiram diferentes graus de imunidade protetora contra esporozoítas do *P. yoelii* (SOARES; RODRIGUES, 1998). No entanto, a combinação de dois vetores virais expressando a proteína CS demonstrou ser superior a formulações vacinais

baseadas apenas em um tipo de vírus (LI et al., 1993; GONZALEZ-ASEGUINOLAZA et al., 2003). Outros estudos baseados em vacinas de DNA contendo o gene inteiro da proteína CS seguido por uma dose de reforço com vetor viral codificando o epitopo CS relataram aumento significativo na indução de respostas mediadas por células T $CD8^+$-específicas (SEDEGAH et al., 1998; SEDEGAH et al., 2000).

Devido a importância de células T $CD8^+$ CS-específicas para o controle da malária estágio pré-eritrocítico, CS foi escolhido como antígeno modelo para a avaliação do potencial adjuvante de flagelina de *Salmonella* no contexto da ativação de linfóticos T $CD8^+$.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o potencial adjuvante de flagelinas derivadas de *S.* Typhimurium e *S.* Muenchen para ativação de respostas imunológicas celulares mediadas por linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$. Para este objetivo utilizamos os antígenos p24 do HIV-1, E7 do HPV-16, gp43 do *P. brasilienses* e CS do *P. yoelli* como modelos. Foram elaboradas diferentes formulações, desde vacinas de primeira geração, utilizando-se Salmonelas atenuadas; vacinas de subunidades utilizando-se peptídeos codificando epítopos T ou recombinantes destas proteínas purificadas; e, vacinas de DNA codificando a informação genética do antígeno e adjuvante. Estas formulações foram administradas a camundongos BALB/c e C57BL/6 por diferentes vias, e as respostas imunológicas induzidas avaliadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Clonagem e purificação da flagelina recombinante

3.1.1 Clonagem do gene fliCi

A amplificação do gene *fliCi* que codifica para flagelina de *S.* Typhimurium foi realizada pelo método de PCR a partir do plasmídeo pFF408 (MASSIS et al., 2008) utilizando-se os iniciadores 5'-GGG GAA TTC ATG GCA CAA GTC ATT AAT ACA-3' e 5'-GGC AAG CTT GAC GCA GTA AAG AGA GGA C-3', desenhados a partir da seqüência de nucleotídeos do gene, disponível no gene bank (AAL20871.1). Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação continham os sítios de restrição *Eco*RI and *Hin*dIII (em negrito). O produto do PCR purificado (Kit PCR Clean-Up System, Promega) foi inserido de forma integral no vetor comercial pET28a (Novagen), previamente digerido com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Hind*III (Fermentas). Para a reação de ligação foram utilizados 100 ng do produto de PCR purificado e 50 ng do vetor pET28a digerido, 1 U de ligase, 4 µl tampão e água q.s.p. 20 µl por reação. A mistura de ligação foi utilizada na transformação de células DH5α eletrocompetentes (*E. coli* K12). A clonagem foi confirmada por enzimas de restrição e sequenciamento do gene *fliCi* atravéz da técnica de interrupção de síntese com dideoxinucleotídeos marcados com fluorocromos. Utilizou-se o seqüenciador automático (ABI 377, Perkin-Elmer Applied Biossystems) disponível no departamento de Bioquímica/FCF da USP e reagentes do kit comercial "Big Dye terminator DNA sequecing" (Perkin-Elmer Applied Biosystem) e oligonucleotídeos iniciadores 5'-CAT ACA TAT GGC GCA AGT GAT TAA TAC-3' e 5´-CCA GGT GCC TAC ACC CCG-3´. Todos os oligonulceotídeos foram obtidos da Integrated DNA Technologies (IDT). Os perfis de restrição foram visualizados em gel de agarose 0,8% (m/v).

O plasmídeo recombinante contendo o gene *fliCi* foi denominado pETFliCi (Figura 4) e introduzido em diferentes linhagens de *E. coli* modificadas para a expressão de proteínas. De cada linhagem albergando o plasmídeo de interesse foi preparado um lote de trabalho a partir de uma colônia isolada e estocado a -80 ^{0}C em 30% de glicerol (como crioprotetor) para posterior análise de estabilidade plasmidial e expressão da flagelina recombinante (rFliC). As linhagens com expressão positiva de flagelina foram mantidas em estoque e utilizadas para produção e purificação da flagelina.

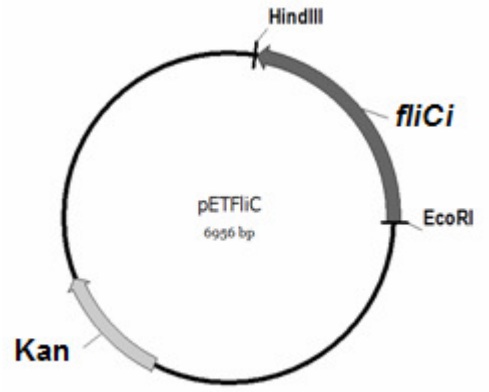


Figura 4 - Representação esquemática do vetor pETFliCi. O gene *fliCi* (1,5 kb) que codifica para a flagelina FliC*i* de *S.* Typhimurium foi amplificado por PCR a partir do plasmídeo pFF408 e inserido no plasmídeo pET28a previamente digerido com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Hind*III. O plasmídeo pFF408 contém um inserto de DNA cromossômico de *S*. Typhimurium que codifica para o gene *fliCi*.

3.1.2 Produção da flagelina recombinante

50 µL do lote de trabalho da linhagem *E. coli* BL21(DE3) abrigando o plasmídeo pFliC*i* foram inoculados em 50 mL de meio Luria Bertani (LB) suplementado com 50 µg/mL de canamicina. A cultura foi incubada a 37 ^{0}C sob agitação de 200 rpm em agitador orbital por aproximadamente 18 horas. Esta cultura foi utilizada como pré-inóculo com diluição inicial de 1:100 para cada 1L de LB (acondicionado em erlenmeyer com capacidade de 3L) e incubado a 37 ^{0}C, 200 rpm em agitador orbital até o início da fase de crescimento exponencial (DO_{600nm}= 0,6), quando adicionou-se à cultura o indutor IPTG na concentração final de 0,5 mM. A cultura induzida foi mantida por um período de 2-4 horas e ao final da indução, centrifugada a 12.000xg por 30 minutos a 4 ºC, o sobrenadante descartado e as células armazenadas. A massa de células correspondente a 18L (~30 mg) foi ressuspensa em 1 L de tampão A (0,1 M de Tris-HCL, 0,5 M de NaCl, pH 7,2) e adicionado inibidor de protease PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride) na concentração final de 1 mM. A suspensão bacteriana foi submetida à disrupção por alta pressão no equipamento Galton Maulin durante 5 minutos. Esse homogenato foi centrifugado por 60 minutos a 12.000xg, o sobrenadante coletado e filtrado a 0,22 µm e utilizado para purificação da rFliC.

3.1.3 Purificação da flagelina recombinante

O extrato foi aplicado no aparelho AKTA FPLC (Amersham Pharmacia Biotech) e passado através de uma coluna de cromatografia de afinidade ao níquel HisTrap^{TM} FF 5 mL (GE Healthcare Life Sciences) previamente equilibrada com tampão A. Após a injeção da amostra, a um fluxo de 1 mL por minuto, a coluna foi novamente lavada com 100 mL de tampão A acrescido de 5% de tampão B (50 mM de imidazol) e o aparelho programado para aplicar um gradiente crescente de imidazol (5-100%) proveniente do tampão B (0,1 M de Tris-HCL, 0,5 M de NaCl, 1 M imidazol, pH 7,2), ou re-programado conforme condições de refinamento da purificação. As frações eluídas foram confirmadas para a presença de flagelina e contaminantes por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15% e as frações com maior pureza foram misturas e dializadas contra 20 volumes de PBS pH 7,2 para retirada do imidazol. Após esta etapa, a concentração de proteína foi ajustada para 1 µg/mL e acrescentado Triton X-114 na concentração final de 1%. Após a adição de Triton, a amostra foi homogeneizada suavemente e depois incubada por 30 min no gelo, sendo agitada em vortex a cada 10 min. Após este período a amostra foi incubada por 15 min a 37^{0}C para permitir a formação de fases, depois centrifugada a 3.000 x g por 5 min em temperatura ambiente. A fase aquosa foi recuperada cuidadosamente para evitar contaminação com o triton da fase inferior e transferida para um novo tubo contendo Triton 1%. Esse ciclo foi repetido 10X ou até a redução de LPS para o nível desejado. Por fim, realizamos a remoção do Triton remanescente por meio da lavagem (3X) com solução fisiológica apirogênica em filtro de celulose do tipo AMICON com corte de 10 kDa (Millipore). As amostras foram novamente quantificadas por BCA (Pierce) e analisadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% para verificação da presença de contaminantes. Além disso, a quantidade de endotoxina foi determinada pelo ensaio colorimétrico LAL (Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate assay QCL-1000) (Cambrex Bio Science) e ficaram abaixo de 2.0 EU/µg de proteína.

3.2 Purificação das proteínas recombinantes p24 e E7

As proteínas p24 do HIV-1 e E7 do HPV-16 foram previamente clonadas nos vetores pET28b (pETp24) e pET28a (pETE7), respectivamente. A construção

pETp24 foi realizada pelo grupo do Prof. Dr. Armando Ventura da Universidade de São Paulo, enquanto a construção pETE7 foi realizada por membros do nosso grupo. O gene da proteína p24 foi clonado de forma integral no vetor pET, nos sítios de restrição *Nhe*I e *EcoR*V. Por outro lado, apenas os 60 primeiros aminoácidos da proteína E7 (98 aminoácidos total) foram clonados no vetor pET28a, nos sítios de restrição *Nde*I e *Hind*III. Os 38 aminoácidos da região C-terminal da E7 formam uma estrutura em dedo de zinco que torna a proteína altamente instável e por isso foram removidos. No entanto, esta deleção preservou o epítopo T CD8 imunodominante da proteína presente na região N-terminal.

As proteínas recombinantes p24 e E7 foram produzidas na linhagem BL21(DE3) transformadas com os respectivos plasmídeos, e purificadas por cromatografia de afinidade em coluna niquelada (His Trap 5 mL, GE) em função da ligação específica da cauda de histidina ao metal. O processo de produção e purificação utilizado foi o mesmo descrito para a produção/purificação da flagelina recombinante. Os tampões utilizados para purificação da proteína E7 foram os mesmos utilizados para flagelina, enquanto aqueles utilizados para purificação da p24 foram diferentes: Tampão A (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl e pH 8,0) e Tampão B (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 1 M imunidazol e pH 8,0). A eluição das proteínas foi realizada pelo aumento gradual da concentração de imidazol ou tampão B. As proteínas eluídas foram dialisadas contra 20 volumes de PBS em AMICON (Millipore) com corte de 5 kDa e tratadas com Triton X-114 para remoção de LPS. As amostras foram quantificadas por BCA ou espectrofotometria a 280 nm e analisadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15% para verificação da presença de contaminantes. A quantidade de endotoxina determinada pelo ensaio colorimétrico LAL nas proteínas p24 e E7 também ficaram abaixo de 2.0 EU/µg de proteína.

3.3 Construção das vacinas de DNA

A construção dos vetores pE7 e pgDE7 foi realizado por Lásaro et al. (2005). Resumidamente, o gene que codifica para E7 do HPV-16 foi amplificado por PCR sem seu códon de terminação a partir do genoma total de HPV-16 (gentilmente cedido pelo Dr. Willy Beçak, Instituto Butantan). O gene de E7 do HPV-16 foi clonado no sítio de *Apa*I da seqüência da gD do HSV-1 presente no plasmídeo pRE4. O vetor pRE4 contém promotor do vírus rous sarcoma (RSV), o gene que

confere resistência à ampicilina e o sinal de poliadenilação do vírus 40 de simian (SV40).

A construção dos plasmídeos pFliC e pFliC-E7 foi realizada após clonagem do gene sintético FliC-E7 (GeneScript), que contém as seqüências do gene da E7 do HPV-16 fusionado ao gene da flagelina FliC*d* de *S.* Mueenchen, em substituição à região central hipervariável, e inserido no vetor para expressão em células eucariotas pPoly. As seqüências de códons de *E7* e *fliC* foram otimizadas para expressão em células humanas. Além disso, na seqüência do gene *E7* foram realizadas duas mutações pontuais para impedir a interação da proteína E7 com a proteína celular Rb, evitando assim o potencial oncogênico de E7. Tais mutações consistiram na troca de uma cisteína por uma glicina na posição 24 da E7 e de um ácido glutâmico por uma glicina na posição 26 da E7. O vetor pPoly contém promotor do vírus 40 de simian (SV40).

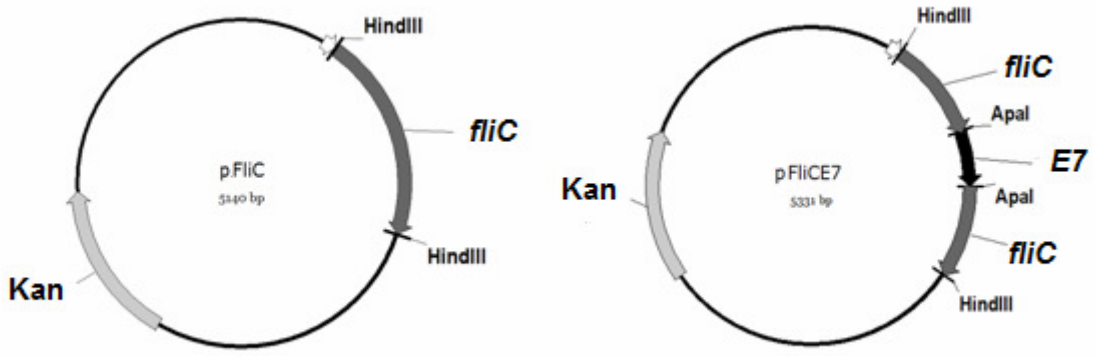


Figura 5 - Representação esquemática do vetor pFliC e pFliC-E7. A seqüência genética que codifica para E7 do HPV-16 foi sintetizada em fusão à sequência do gene da flagelina FliC*d* de *S.* Mueenchen, em substituição à região central hipervariável, e inserido no vetor pPoly para expressão em células eucariotas. Depois de sintetizada a proteína de fusão permanece no citoplasma das células uma vez que não dispõe de sequência de exportação.

A obtenção dos plasmídeos para serem usados nas imunizações foi realizada através de propagações em larga escala em linhagens de *Escherichia coli* DH5α transformadas com os diferentes vetores, em meio LB suplementado com canamicina (50 μg/mL), seguido da purificação dos plasmídeos utilizando o kit de purificação de plasmídeos de "Giga Prep" (QIAGEN Endo Free Plasmid Giga, QIAGEN), segundo as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro a 260 nm e confirmadas por inspeção visual em

gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, utilizando para comparação, fragmentos de DNA padrões com concentrações conhecidas (Invitrogen). Os plasmídeos foram mantidos a -20 ^{o}C até o momento de uso, quando a concentração foi ajustada para 1 µg/µL em PBS.

3.4 Linhagens celulares

A linhagem celular TC-1 (LIN et al., 1996), derivada de células primárias do epitélio pulmonar de C57BL/6 transformadas com v-Has-ras e os genes de E6 e E7 do HPV-16, foi gentilmente cedida pelo Dr. T.C. Wu (Universidade Johns Hopkins, EUA). As células TC-1 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio, 2 mM aminoácidos não essenciais, 10 mM tampão HEPES, 50 U/mL penicilina/estreptomicina, 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas a 37 °C e 5% de CO2. Para o desafio de camundongos C57BL/6, as células foram tratadas com tripsina, lavadas duas vezes, e ressuspendidas em meio DMEN sem soro, na concentração apropriada para a inoculação, em volume final de 100 µL por camundongo.

Para determinação da bioatividade da flagelina foram usadas células HEK293 e HEK293 transfectadas com plasmídeo contendo o gene que codifica o receptor TLR5 (Invivogen). As células foram mantidas em meio DMEM acrescido de 10% SFB e blasticidina (10 µg/mL) durante duas semanas. Um dia antes do desafio, $5x10^4$ células/poço foram adicionadas a placas de 96 poços e mantidas por 12 h. Flagelina foi adicionada em diferentes concentrações e incubada por 5 h. Após este período o sobrenadante da cultura de células foi coletado para dosagem da produção de IL-8 humana por ELISA com o kit BD OptEIA (BD Biosciences).

3.5 Protocolos de Imunização

Os experimentos de imunização foram realizados com camundongos BALB/c, C57BL/6 e $TLR5^{-/-}$ com idade entre 6 e 10 semanas. Os animais foram adquiridos do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Parasitologia da Universidade de São Paulo e manuseados de acordo com as normas estabelecidas pela comissão de ética do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Grupos de 5 a 10 animais foram imunizados com diferentes formulações

vacinais contendo flagelina (5 µg/dose) ou LT (1 µg/dose) como adjuvantes para os antígenos protéicos p24 (20 µg) e E7 (20 µg). Quando indicado, alguns animais foram imunizados com os peptídeos $E7_{49-57}$(RAHYNIVTF) e P10 (QTLIAIHTLAIRYAN) nas doses de 25 e 20 µg/animal/dose, respectivamente. Em alguns experimentos o esquema de imunização utilizado teve início no segundo dia após o desafio com células TC-1. Foram administradas de 3-5 doses a intervalos de uma ou duas semanas, conforme indicado.

Além disso, formulações contendo p24+flagelina foram administradas apenas pelas vias intradérmica (i.d.) ou subcutânea (s.c), no volume de 20 ou 100 µL/animal/dose, administradas com intervalos de duas semanas entre as doses. As formulações contendo E7+flagelina foram administradas pelas vias intranasal (i.n.) e s.c. no volume final de 20 e 100 µL por animal/dose, respectivamente. Os animais foram imunizados sempre a intervalos de uma semana, independente da via de administração.

Vacinas de DNA foram inoculadas via intramuscular (i.m.) nos músculos tibial anterior de cada pata. A dose de plasmídeo utilizada foi de 100 µg de DNA diluído em 100 µl de PBS/dose/animal, aplicados 50 µl em cada pata do animal.

3.6. Desafio dos animais com células tumorais TC-1

Camundongos C57BL/6 foram utilizados para avaliação profilática ou terapêutica das formulações contendo o antígeno E7 do HPV-16. No dia do desafio as células foram lavadas 2X com meio DMEN acrescido de 10% SFB e por fim ajustadas para as concentrações de $7,5x10^5$ células/mL (para desafio pela via s.c.) e $1,0x10^5$ células/mL (para desafio pela via i.v.) em meio DMEN sem soro e inoculadas, 100 µL/animal, na região dorso-lateral (para desafio s.c.) ou veia do plexo retro orbital (para desafio i.v.). As células TC-1 desenvolvem tumores palpáveis a partir de 10 dias quando administradas pela via s.c. ou tumores pulmonares a partir de 6 semanas, quando administradas pela via i.v.

O acompanhamento da evolução dos tumores nos ensaios de proteção terapêutica com desafio via s.c. foi realizado duas vezes por semana durante um período mínimo de 40 dias. Os tumores quando presentes foram medidos com o auxílio de um paquímetro e os animais que apresentaram tumores maiores que 1,5 cm de diâmetro foram submetidos à eutanásia. Animais desafiados via i.v. foram

submetidos à eutanásia no quadragésimo dia após o desafio e os pulmões removidos para contagem do número de nódulos tumorais.

3.7. ELISA para detecção de anticorpos e citocinas

A imunogenicidade da proteína recombinante p24 do HIV-1 foi realizada por ELISA em placa Maxisorp (Nunc International) utilizando-se soro de indivíduo infectado com HIV-1 (cat. 192) ou soro policlonal de coelho (cat. 4250) adquiridos do "*NIAID AIDS Research and Reference Reagent Program*". Em cada poço da placa foi aplicado 100 µL de uma solução contendo 0,5 µg/mL de proteína p24 purificada diluída em PBS pH 7,5 e incubada a 4 ^{o}C durante uma noite. Após lavagem (3 vezes com PBS-T), foi adicionado 100 µL de solução de bloqueio (5% de leite desnatado em PBS-T) à cada poço, e a placa mantida à 37 ^{o}C por 2 horas. Após este período repetimos as lavagens (3 vezes com PBS-T) e adicionamos os soros (100 µL), previamente diluídos em solução bloqueadora e mativemos a placa por 1 h a 37 ^{o}C. Ao final deste período, seguiu-se um novo ciclo de lavagens e o segundo anticorpo anti-IgG de humano ou de coelho conjugado à peroxidase (Southern Biotech) foi adicionado no mesmo volume de 100 µL e incubado por mais 1 hora a 37 ^{o}C. Por fim a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e revelada com 100 µL/poço da solução contendo o substrato da peroxidade OPD ("o-*phenylenediamine*") (concentração final 1 mg/mL) e 8 µL de H_2O_2 (concentração final 0,012%) por 30 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Por fim a reação foi interrompida com 50 µL por poço de de ácido sulfúrico (1 M). A leitura da densidade óptica foi realizada a 492 nm em leitor de placa (Multiscan MS- Labsystems).

A dosagem de citocinas no soro, sobrenadante de culturas de células e sobrenadante de homogenado de pulmão foi realizada utilizando-se o kit BD OptEIA (BD Biosciences) anti-(IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IFN-□,TNF-α, TGF-β) de camungongo ou anti-IL-8 humana, de acordo com instruções do fabricante. O sobrenadante do pulmão dos animais foi preparado conforme previamente descrito no artigo em anexo (BRAGA et al., 2009). O ensaio para dosagem de IL-8 está descrito em detalhes no artigo em anexo (BRAGA et al., 2010).

3.8 Ensaio de marcação intracelular de IFN-□ em células T

A marcação de IFN-□ intracelular foi realizada com células do sangue periférico ou baço de camundongos imunizados 14 dias após a administração da formulação vacinal. As células foram tratadas por 5 minutos no gelo com Ack Lising Buffer (BioSource International) até ruptura das hemácias e então centrifugadas a 1.500xg por 5 minutos. As células foram incubadas a uma concentração de $1x10^6$ células/poço por 6 horas a 37 ^oC em atmosfera de 5% de CO_2 na presença de Brefeldin A (GolgiPlug; BD Biosciences) e ausência ou presença do peptídeo específico de $E7_{49-57}$ MHC classe I (K^b) restrito (aminoácidos 49-57; RAHYNIVTF) (FELTKAMP et al., 1993) ou $p24_{197-205}$ MHC classe I ($H2-K^d$) restrito (aminoácidos 197-205; AMQMLKETI) ou $p24_{197-211}$ MHC classe II ($I-A^d$) restrito (aminoácidos 197-211; AMQMLKETINEEAAE). Após este período, as células foram incubadas por 30 minutos a 4 ºC com anticorpo anti-CD8 conjugado com fluoresceína (FITC) ou anti-CD4 conjugado com ficoeritrina-Cy-5 (PECy-5) (BD Biosciences). Após permeabilização com Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) por 20 minutos a 4 ºC, as células foram tratadas com anticorpo anti-IFN-□ conjugado a ficoeritrina (PE) (BD Biosciences) por 30 minutos a 4 ºC. As células foram ressuspendidas em PBS e examinadas por citometria de fluxo utilizando o aparelho FACS Calibur (BD Biosciences). Os dados foram analisados com o auxílio do programa FlowJo para a determinação das porcentagens de células $CD4^+$/IFN-□$^+$ e $CD8^+$/IFN-□$^+$ sobre o total de linfócitos T $CD4^+$e $CD8^+$.

3.9 *Enzyme-linked immunosorbent spot* (ELISPOT)

ELISPOT foi realizado para detectar células produtoras de IFN-ɣ específicas mediante estímulo com os peptídeos: T $CD4^+$ da proteína ($p24_{197-211}$), e T $CD8^+$ das proteínas E7 ($E7_{49-57}$) e p24 ($p24_{197-205}$). Esse ensaio detecta citocinas secretadas em resposta a estímulo *in vitro* em nível de uma única célula e foi realizado segundo metodologia descrita anteriormente (MIYAHIRA et al., 1995). $2x10^5$ células do baço ou do sangue foram adicionadas em cada poço de uma placa de 96 poços (Millipore), previamente sensibilizada com anticorpo monoclonal de captura anti-IFN-ɣ de camundongo (BD Biosciences) na concentração de 10 µg/mL. As células foram incubadas por 24 h a 37 ^oC em atmosfera de 5% de CO_2 na ausência ou presença

do estímulo (1 µg/mL de peptídeo). No dia seguinte, as células foram desprezadas, a placa lavada 3 vezes com PBS e 5 vezes com PBS-T e incubada com anticorpo monoclonal biotinilado anti-IFN-ɣ de camundongo (BD Biosciences) na concentração final de 2 µg/mL. Após uma noite a 4 °C, a placa foi novamente lavada e incubada com estreptavidina peroxidase (SIGMA) por 2 h a temperatura ambiente. Ao final deste tempo a placa foi lavada e submetida à revelação com AEC substrate (BD Biosciences) por 20 minutos. Os "*spots*" foram contados com auxílio de uma lupa e do equipamento ImmunoSpot (Cellular Technology, Ltd.).

3.10 Citotoxicidade *in vivo*

O ensaio de citotoxicidade *in vivo* foi realizado para verificar a presença de células T $CD8^+$ citotóxicas, específicas para os peptídeos E7 ($E7_{49-57}$) e p24 ($p24_{197-205}$), em animais imunizados, de acordo com metodologia descrita por (BARBER; WHERRY; AHMED, 2003). Após sete dias da imunização, um grupo de animais não imunizados foi submetido à eutanásia, seus baços recuperados e as células utilizadas para marcação com CFSE. Cerca de $2x10^8$ células foram incubadas com 0,5 µM ou 5 µM de CFSE em PBS, por 15 minutos a 37 ºC. Após a incubação, as células foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI acrescido de 1% de soro fetal bovino (RPMI-1%). Ao tubo contendo a população de células marcadas com 5 µM de CFSE foi adicionado 25 µM do peptídeo de interesse, e incubado por 40 minutos a 37 ºC. Após este período as células foram lavadas com meio RPMI-1% para remoção do peptídeo e contadas. Quantidades iguais das duas populações de células marcadas foram misturadas e centrifugadas a 1.700xg. O precipitado de células foi ressuspenso em RPMI (sem soro fetal bovino) de modo a conter 2-4 x 10^7 células/200 µL e injetado em todos os animais imunizados e no grupo não imunizado, via i.v. na veia do plexo retro orbital. No dia seguinte, todos os animais foram submetidos a eutanásia e as células dos baços coletadas. As células foram ressuspensas em PBS e examinadas por citometria de fluxo para detecção de fluorescência emitida pelas duas populações celulares utilizando o aparelho FACScalibur™(Becton Dickinson, Mountain View, CA). Foram contados 10.000 eventos da população marcada com 0,5 µM. Os dados foram analisados pelo programa "FlowJo" para a determinação das porcentagens de células marcadas com 0,5 µM ou 5 µM de CFSE.

3.11 Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

A detecção de TLR2 a 9 e Naip5 foi realizada utilizando-se iniciadores específicos para cada um deles, cedidos pela Dra. Elaine Rodrigues da Universidade Federal de São Paulo e cujo as sequências estão apresentadas na Tabela 1. Para realização dos RT-PCRs semi-quantitativos foram utilizados cerca de $1x10^7$ células TC-1 para extração de RNA com o reagente Trizol (Invitrogen), segundo protocolo fornecido pelo fabricante. O RNA obtido foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm e aplicado em gel de agarose 1% (~5 µg de RNA diluído em tampão contendo 1 M de uréia) para avaliação da integridade do mesmo, que em seguida foi utilizado para a síntese de cDNA. Antes da síntese realizamos um tratamento das amostras com DNAse para eliminar possível contaminação com DNA genômico. O cDNA foi sintetizado utilizando-se o kit Thermoscript RT-PCR System for First Strand cDNA Syntesis (Invitrogen), segundo protocolo fornecido pelo fabricante. Além disso, para cada amostra de RNA incluimos um controle no qual todos os reagentes necessários à síntese de cDNA foram adicionados, exceto a transcriptase reversa. Além disso, a amostra também foi submetida a PCR com inicadores específicos para HPRT, utilizado como controle da expressão endógena (tabela 1).

As reações para RT-PCR foram preparadas de modo a conter: iniciadores específicos na concentração de 0,4 µM, 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM de nucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 2,5 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) e tampão de PCR fornecido com a enzima. A Platinum Taq foi utilizada para que fosse possível realizar Hot-Start PCRs, de modo a aumentar a especificidade das amplificações. Os ciclos de PCR utilizados foram os seguintes: pré-denaturação por 5 minutos a 94 ºC; 35 ciclos de denaturação (94 ºC, 1 min), anelamento (60 ºC, 40s) e extensão (72 ºC, 1 min); extensão final a 72 ºC por 10 minutos. Os produtos de PCR foram sempre analisados por eletroforese em gel de agarose 2% com 0,5 µg/mL de brometo de etídio e submetido à tensão de 100 V. Utilizou-se marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) para determinar os tamanhos das bandas produzidas nos géis.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de PRRs por RT-PCR

PRR	Sequência dos iniciadores (R) reverso e (F)	Tamanho do Fragmento
TLR1	**J:** 5'-GGA CCT ACC CTT GCA AAC AA-3' **M:** 5'-GGT GGC ACA AGA TCA CCT TT-3'	250 pb
TLR2	**J:** 5'-CGT TGT TCC CTG TGT TGC T-3' **M:** 5'-AAA GTG GTT GTC GCC TGC T-3'	119 pb
TLR3	**J:** 5'-TTG TCT TCT GCA CGA ACC TG-3' **M:** 5'-CGC AAC GCA AGG ATT TTA TT-3'	205 pb
TLR4	**J:** 5'-TTC ACC TCT GCC TTC ACT ACA-3' **M:** 5'-GGG ACT TCT CAA CCT TCT CAA-3'	225 pb
TLR5	**J:** 5'-AGC TGG TCT TCA AGG ACA AG-3' **M:** 5'-CCT GGA TGT TGG AGA TAT GG-3'	210 pb
TLR6	**J:** 5'- CCAAGAACAAAAGCCCTGAG-3' **M:** 5'- TGTTTTGCAACCGATTGTGT-3'	115 pb
TLR7	**J:** 5'-GCT GTG TGG TTT GTC TGG TG-3' **M:** 5'-CCC CTT TAT CTT TGC TTT CC-3'	270 pb
TLR8	**J:** 5'-TGC GCT ACC ACC TTG AAG AG-3' **M:** 5'-CAC TGG TTC CAG GAG GAT GA-3'	248 pb
TLR9	**J:** 5'-ACC TCA GCC ACA ACA TTC TC-3' **M:** 5'-TGC ACC TCC AAC AGT AAG TC-3'	142 pb
Naip5*	**J:** 5'-GCT ACA ATG AAC AGT GCC TTT TTA-3' **M:** 5'-TCC AGC CTG ACC ATG AGT TTC TA-3'	451 pb
HPRT	**J:** 5'-GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT -3' **M:** 5'-GAG GGT AGG CTG GCC TAT AGG CT-3'	448 pb

* De modo a diferenciar Naip5 de 6 e 7. **J**, à jusante e **M**, à montante do gene HPRT (*hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*)

3.12 Análise estatística

Foram aplicados os testes estatísticos one-way ANOVA test seguido por Tukey HSD tests. Diferenças com $p \leq 0{,}05$ foram consideradas significantes. Símbolos utilizados no trabalho foram *: $p<0.05$; □: $p<0.01$ e □□: $p<0.001$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do potencial adjuvante da flagelina de *S.* Typhimurium (FliC*i*) e S. Muenchen (FliC*d*) para ativação de linfócitos T

O potencial adjuvante das flagelinas FliC*d* e FliC*i* de *Salmonella* foi avaliado para a capacidade de promover ativação de linfócitos T $CD4^+$ e $TCD8^+$ específicos para antígenos derivados de vírus, célula tumoral, fungo e parasita, em diferentes abordagens vacinais. Os resultados serão apresentados em quatro capítulos. Primeiramente apresentaremos os resultados obtidos com a utilização de flagelina como adjuvante para o antígeno p24 do HIV-1 (capítulo I); seguido pelos resultados obtidos com o antígeno E7 no modelo de tumor induzido por HPV-16 (capítulo II). Os resultados obtidos com os antígenos gp43 e P10 no modelo de paracoccidioidomicose experimental (capítulo III) e aqueles obtidos com o antígeno CS no modelo de malária murina (capítulo IV) serão apresentados na forma de artigos em anexo; enquanto os capítulos (I) e (II) serão apresentadas no formato tradicional, com apresentação de resultados e discussão. Ao final da apresentação dos resultados e discussão específicos de cada parte, apresentamos um tópico com "Considerações finais" sobre a importância dos adjuvantes, especificamente flagelina, para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas.

4.1.1 Avaliação do potencial adjuvante da flagelina **FliC***i para ativação de linfócitos T CD4$^+$ e T CD8$^+$ específicos para o antígeno p24 do HIV-1*

O potencial adjuvante da flagelina rFliC*i* para ativação de linfócitos T foi avaliado utilisando o antígeno p24 do HIV-1. A escolha da proteína p24 como antígeno modelo foi baseada na facilidade de produção, presença de epítopos T CD4$^+$ e T CD8$^+$ e devido seu uso frequente como componente de vacinas anti-HIV (BOLESTA et al., 2005; LAL; CHAKRABARTI; YANG, 2005; GUDMUNDSDOTTER et al., 2008).

Nesta parte do trabalho, apresentaremos resultados referentes à clonagem e purificação da forma recombinante da flagelina; caracterização da atividade biológica *in vitro* e *in vivo* da flagelina recombinante; purificação e antigenicidade da proteína recombinante p24 do HIV-1; e avaliação das respostas imunológicas induzidas em animais imunizados com p24 e flagelina como adjuvante. Os resultados apresentados mostram que a flagelina não promoveu níveis detectáveis de ativação de linfócitos T CD4$^+$ e T CD8$^+$ quando co-administrada à proteína p24, em diferentes esquemas de imunização.

4.1.1.1 Descrição dos Resultados

4.1.1.1.1 Clonagem, expressão e purificação da flagelina recombinante

A sequência nucleotídica que codifica para a flagelina fase I de S. Typhimurium (FliC*i*) foi amplificada do plamídeo pFF408 (MASSIS et al., 2008) e inserida no vetor pET28a (Figura 4) conforme descrito na seção de M&M. A inserção do gene *fliCi* foi confirmada por seqüenciamento e o plasmídeo, posteriormente introduzido, por eletroporação, em diferentes linhagens de *E. coli* modificadas para a expressão de proteínas, no entanto, apenas as linhagens BL21(DE3), BL21(Deoplys), e BL21(CycpLys) apresentaram super expressão de uma proteína correspondente ao tamanho predito para a recombinante flagelina (rFliC)(58 kDa) após cultivo na presença de 0,5 mM de IPTG por no mínimo 2 h (dados não apresentados).

A linhagem BL21(DE3) foi escolhida para os procedimentos de purificação da flagelina recombinante, sendo realizado o mesmo procedimento de indução anterior, porém em maior volume. Cerca de 30 mg de massa celular foram lisadas por vez e a fração solúvel, obtida após remoção de debris celulares, foi passada em uma coluna de níquel de 5 mL. Realizamos vários procedimentos para estabelecer as melhores condições de indução e solubilidade da rFliC, incluindo concentração do indutor, tempo e temperatura durante a indução e concentração de imidazol para a eluição da proteína, entre outros parâmetros avaliados. Esses testes serviram para estabelecer as melhores condições para expressão e purificação da rFliC e estão apresentados nas figuras 6A e 6B.

O procedimento adotado para a purificação da proteína incluiu a injeção do extrato total na coluna de níquel com 50 mM de imidazol (5% de tampão B) como estratégia para diminuir a ligação inespecífica de proteínas de baixa afinidade ao níquel. Após, realizamos uma etapa de lavagem com 100 mL de tampão A na mesma concentração de imidazol injetada junto com a amostra (50 mM). Nesta etapa houve pequena perda de flagelina, mas resultou na redução de proteínas contaminantes. A eluição da proteína teve início com a lavagem da coluna com tampão A + 100 mM de imidazol (10% de tampão B) resultando no aparecimento de um pico (platô 1) formado pela liberação de pequena quantidade de flagelina e outros contaminantes, como evidenciado no gel de poliacrilamida, poços 1 a 9

(Figura 6B). Na sequência, a coluna foi lavada com mais 25 mL de tampão A + 300 mM de imidazol (30% de B) e novamente verificamos a ocorrência de um segundo pico (platô 2) formado pela liberação constante de flagelina com poucos contaminantes, canaletas 10 a 18; seguida pela liberação máxima de flagelina a partir da metade da etapa 2, canaletas 19 a 21, gel de poliacrilamida da figura 6B. Os poços 22 a 27 referem-se às alíquotas da etapa 3 (100% de B) e mostram que as perdas de rFliC neste ponto foram desprezíveis. A maior parte da flagelina purificada foi eluída nas frações aliquotadas da segunda metade do segundo pico (canaletas 19-21), mas estas alíquotas ainda apresentaram contaminantes. No entanto após diálise da proteína em solução salina a maioria dos contaminantes foi eliminada.

Na figura 7 apresentamos a análise em SDS-PAGE e imunodetecção do extrato total da linhagem BL21(DE3) albergando o plasmídeo pFliC*i*, antes e após a indução da expressão da flagelina (canaletas 1 e 2), e a proteína rFliC purificada (canaleta 3). A flagelina recombinante, que apresenta massa molecular de 58 kDa, foi confirmada por imunodetecção realizada com anticorpo policlonal, produzido em camundongos imunizados com FliC*i* nativa (diluição 1:10.000) (Figura 7B). Os contaminantes presentes na preparação de flagelina não foram reconhecidos pelos anticorpos FliC-específicos (Figura 7A e 7B). Em conjunto, esses resultados mostram que a flagelina rFliC foi purificada com sucesso por cromatografia de afinidade com pureza máxima de 90%, não sendo possível, até o momento, aumentar esse percentual.

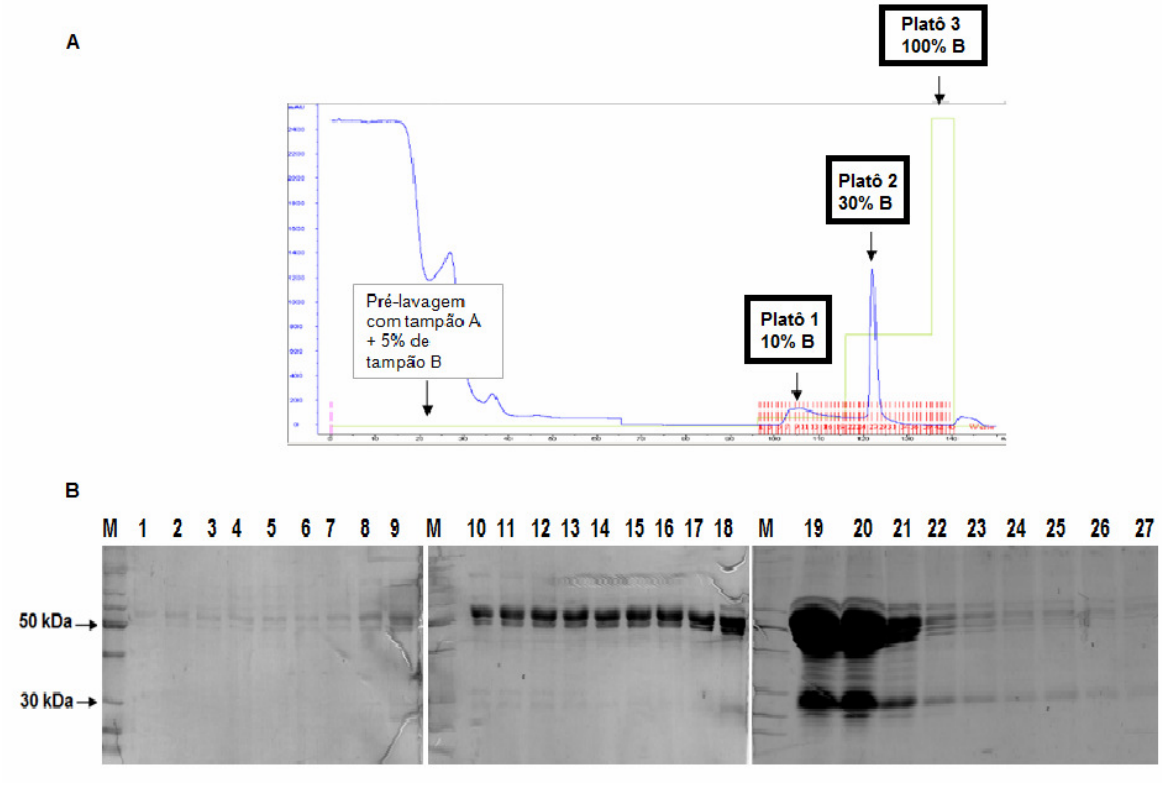


Figura 6 - Purificação da flagelina recombinante por cromatografia de afinidade ao níquel. (A) Cromatograma da purificação de rFliC em coluna niquelada. Cada platô representa as diferentes concentrações de imidazol (tampão B) aplicadas na coluna durante a purificação. As frações de rFliC coletadas estão representadas em vermelho no eixo das abscissas do cromatograma. (B) Gel de poliacrilamida a 12% carregado com 10µL das frações 1-27 coletadas na purificação da proteína rFliC corado com Coomasie Blue. Amostras: M- Padrão de massa molecular (fermentas); canaletas 1-9, amostras coletadas na etapa 1(100 mM de imidazol); canaletas 10-18, amostras coletas no na primeira metade da etapa 2; canaletas 19-21, amostras coletadas no final da etapa 2 (300 mM de imidazol); canaletas 22-27, amostras coletadas na etapa 3 (1 M de imidazol). Cada poço foi carregado com 10 µL de amostra diluída em tampão de corrida.

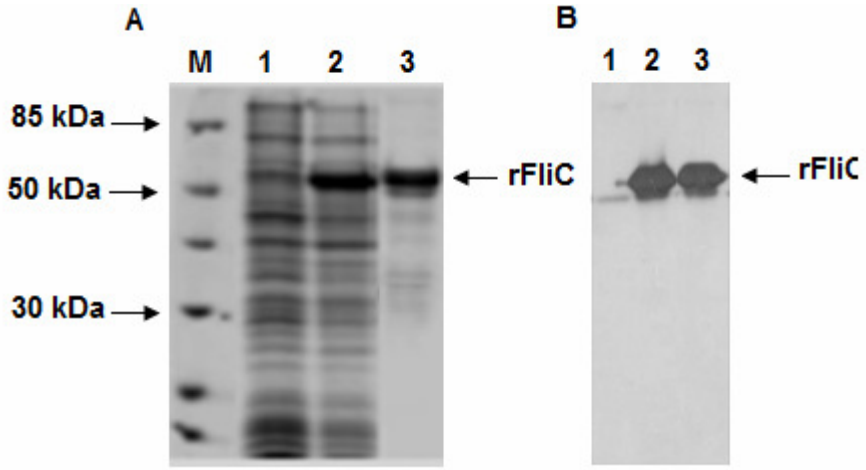


Figura 7 – Expressão e antigenicidade da proteína recombinante FliC de *Salmonella*. (A) Gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) corado com Coomasie Blue, e (B) imunodetecção em filtro de nitrocelulose com anticorpo policlonal anti-FliC produzido em coelho. As canaletas foram carregadas com extrato total da linhagem BL21(DE3) transforamda com o plasmídeo pETFliC*i*. Amostras: Canaletas 1- Extrato total antes da adição de IPTG, 2- Extrato total após adição de IPTG, e 3- proteína rFliC purificada por cromatografia de afinidade ao níquel. M- Padrão de massa molecular (Fermentas).

4.1.1.1.2 Caracterização da atividade biológica da rFliC *in vitro*

A IL-8 é uma citocina pró-inflamatória que apresenta funções na promoção da angiogênese, aumento da permeabilidade vascular, recrutamento de leucócitos e desgranulação de neutrófilos. É produzida em resposta a estímulos provenientes de patógenos onde a ativação de NF-kB leva a um aumento da sua expressão. Para confirmar a funcionalidade de flagelinas recombinantes. Células HEK293 transfectadas ou não para a expressão do TLR5 foram estimuladas com diferentes concentrações de FliC (flagelina nativa) e rFliC. Após 5h de estímulo, o sobrenadante da cultura foi dosado para a produção de IL-8 humana. As curvas dose-resposta apresentadas na figura 8 mostram que não houve diferença na produção de IL-8 no sobrenadante coletado de células HEK293/TLR5^{+} estimuladas com a flagelina nativa ou flagelina recombinante, sugerindo que esta última apresenta estrutura terceária e atividade biológica *in vitro* similar à flagelina selvagem.

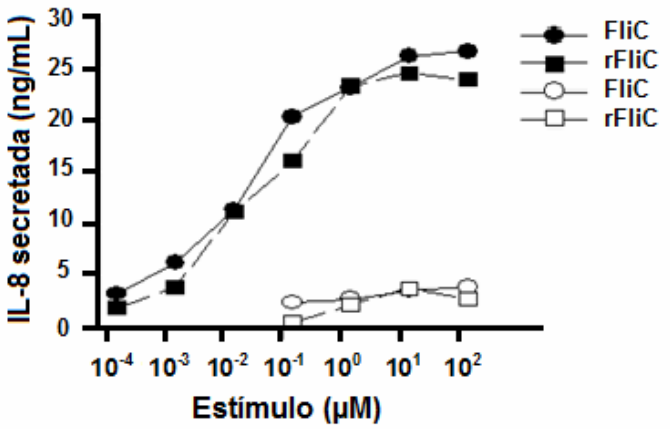


Figura 8 - Produção de IL-8 em células HEK293/TLR5$^+$ estimuladas com flagelinas de *S.* Typhimurium. Células HEK293 transfectadas (símbolos pretos) ou não (símbolos brancos) com gene para expressão de TLR5 foram cultivadas por três semanas na presença de blasticidina. Placas de 96 poços foram cobertas com 50.000 células/poço e incubadas a 37^{0}C em atmosfera de 5% CO_2. No dia seguinte, as células foram incubadas por 5h com concentrações variadas das flagelinas nativa (FliC) e recombinante (rFliC) e o sobrenadante coletado para dosagem de IL-8 por ELISA.

4.1.1.1.3 Caracterização da atividade biológica da rFliC *in vivo*

A IL-6 é produzida principalmente por macrófagos em resposta à ligação de PAMPS aos receptores toll-like de sua superfície, e a sinalização por qualquer TLR leva à produção desta citocina, sendo sua detecção utilizada para comprovação da funcionalidade desses receptores ou de flagelinas recombinantes *in vivo*. A produção de IL-6 foi detectada no soro de camundongos BALB/c inoculados via parenteral com apenas uma dose das flagelinas FliC ou rFliC com o objetivo de investigar se as propriedades imunoestimuladoras da flagelina recombinante estavam preservadas. Após a inoculação i.p. de 5 µg de FliC ou rFliC, o soro dos animais foi coletado após 30 min, 2 h, 4 h ou 6 h, armazenado e utilizado para dosagem da IL-6 por ELISA. A análise comparativa da produção de IL-6 *in vivo,* apresentada na figura 9A, mostra que a flagelina recombinante induziu similar produção de IL-6 quando comparada a quantidade produzida em animais inoculados com flagelina nativa. Verificamos que a produção de IL-6 iniciou logo após 30 min da inoculação, atingindo o pico de produção em 2 h quando começou a diminuir drásticamente, voltando aos níveis basais após 6 h da inoculação de flagelina. Esse perfil foi visualizado em qualquer dose utilizada (0,5 a 5 µg/animal) (dados não

apresentados) administrada pela via i.p. (via padrão utilizada para este ensaio); servindo como parâmetro para avaliar a qualidade da flagelina produzida. Além disso, verificamos que a produção de IL-6 apresentou o mesmo perfil em camundongos BALB/c que foram inoculados com a dose de 5 µg de rFliC por diferentes vias de administração (Figura 9B). No entanto, a inoculação da rFliC pelas vias i.d. ou s.c., vias utilizadas neste trabalho, apresentou cinética diferente daquele visualizada para inoculação i.p., onde o pico de produção de IL-6 ocorreu após 4 h (via i.d.) e 6 h (via s.c.) da inoculação, ocorrendo o decaimento apenas após 6 h da inoculação (Figura 9B). Além disso, a produção desta citocina após inoculação pelas vias i.d. ou s.c. foi bem menor que aquela produzida pela inoculação i.p. Esses dados mostram que a flagelina induz a produção diferencial de IL-6 na dependência da via de inoculação utilizada, mas a significância desse efeito permanece não esclarecida.

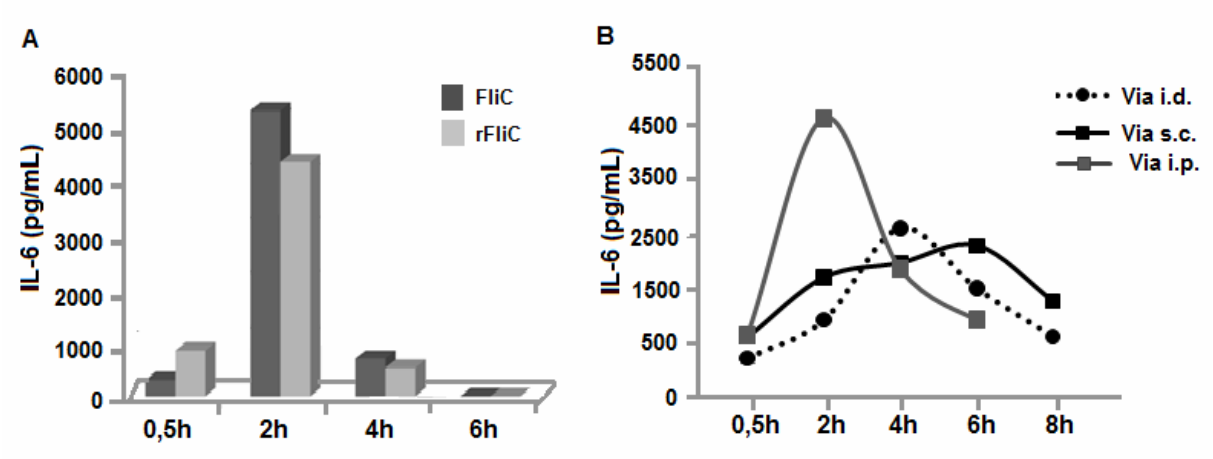


Figura 9 - Cinética da produção de IL-6 após estímulo *in vivo* com flagelinas de *S.* Typhimurium. Após a inoculação da flagelina, o soro dos animais foi coletado nos tempos indicados e utilizados para a dosagem de IL-6 por ELISA. (A) Análise comparativa da produção de IL-6 no soro de camundongos BALB/c inoculados via i.p. com 5 µg de flagelina FliC ou rFliC; (B) Produção de IL-6 em animais BALB/c inoculados com 5 µg rFliC pelas vias i.d., s.c. e i.p. A dosagem de citocinas foi realizada por ELISA, conforme instruções do fabricante.

4.1.1.1.4 Expressão e purificação da proteína recombinante p24 do HIV-1

A proteína p24 recombinante foi produzida em *E. coli* BL21(DE3) transformada com o plasmídeo pETp24 e purificada a partir da fração solúvel por cromatografia de afinidade ao níquel. A linhagem albergando o plasmídeo que codifica para p24 foi cultivada em meio LB e quando a DO_{600} chegou a 0,6 foi adicionado IPTG (concentração final de 0,5 mM) e a cultura mantida sob agitação por no mínimo 2 h. Alíquotas do cultivo recuperadas antes (canaletas 1) e após (canaletas 2) a adição de IPTG foram coletadas para análise (Figura 10) e o restante do cultivo utilizado para purificação da proteína p24. A banda correspondente à proteína p24 (~27 kDa) foi visualizada no extrato total da cultura induzida em SDS-PAGE (Figura 10A, canaleta 2) e confirmada em Western Blot (Figura 10B, canaleta 2) realizado com anticorpo policlonal anti-p24 produzido em coelhos (diluição 1:3.000). A proteína p24 foi eficientemente purificada (pureza >95%) de BL21(DE3) como apresentado nas figuras 10A e 10B, canaletas 3. Além disso, a proteína p24 recombinante purificada foi reconhecida de forma similar tanto por anticorpos de indivíduos infectados com HIV (diluição 1:20.000) (NIH AIDS n^0 192) quanto por anticorpos produzidos em coelhos imunizados com p24 recombinante (1:3.000) (NIH AIDS n^0 4250) em ensaio de ELISA (Figura 10C). Estes resultados indicam que a antigenicidade da proteína p24 recombinante estava preservada.

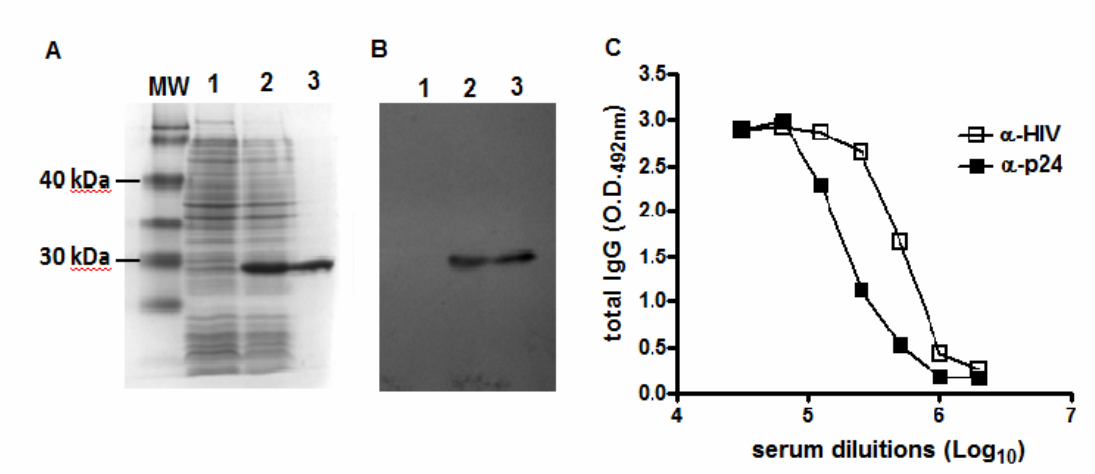


Figura 10 - Expressão e antigenicidade da proteína recombinante p24 do HIV-1. (A) Gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) corado com Coomasie Blue, (B) Imunodetecção em filtro de nitrocellulose utilizando anticorpo policlonal anti-p24 produzido em coelho. As canaletas foram carregadas com extrato total da linhagem BL21(DE3) transformada com pETp24. Amostras: Canaletas 1- extrato total antes da adição de IPTG, 2- extrato total após a adição de IPTG, e 3- proteína p24 purificada por cromatografia de afinidade ao níquel. MW- Padrão de massa molecular pré-corado (Fermentas); (C) Antigenicidade da proteína recombinante p24 demonstrada após reação com soro de indivíduo infectado com HIV-1 (símbolos brancos) ou soro de coelhos imunizados com p24 recombinante (símbolos pretos). Placas de ELISA foram preparadas com a proteína recombinante p24 obtida da fração solúvel e utilizada para reação com anticorpos.

4.1.1.1.5 Avaliação do efeito adjuvante de rFliC para o antígeno p24 do HIV-1

A abordagem utilizada para avaliar o efeito adjuvante da flagelina rFliC para ativação de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ consistiu na inoculação de flagelina junto com o antígeno p24 do HIV-1. Camundongos BALB/c foram imunizados pela via s.c. ou i.d. com 5 doses de cada formulação: p24 (20 µg); rFliC (5 µg) ou a combinação p24+rFliC administradas com intervalos de duas semanas entre as doses. Animais controles foram imunizados apenas com PBS. Duas semanas após a última dose os animais foram submetidos a eutanásia para a análise da ativação de resposta celular por meio dos ensaios: ELISPOT, marcação intracelular de citocinas para a detecção de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ específicos produtores de IFN-□ e o ensaio citotoxicidade *in vivo*.

O ensaio ELISPOT, não revelou a presença de células T $CD4^+$ ou T $CD8^+$ produtoras de IFN-□ específicas para o antígeno p24, em animais imunizados por ambas as vias (dados não apresentados). De modo similar, nenhuma das formulações avaliadas promoveu ativação de linfócitos T $CD4^+$ específicos para p24, uma vez que não houve diferença significativa entre o percentual de células $CD4^+$ IFN-□$^+$ nas amostras incubadas na ausência ou presença de estímulo com peptídeo da proteína p24 (Figura 11, superior). Por outro lado, no grupo imunizado com p24+rFliC podemos verificar discreta ativação de linfócitos T $CD8^+$ (0,286%) específicos, mas esse percentual não foi estatisticamente significativo (Figura 11, inferior). A fraca ativação de células T $CD8^+$ está em acordo com resultados encontrados no ensaio de citotoxicidade *in vivo*, onde não houve diferença no percentual de lise celular entre animais imunizados com o antígeno p24 e os animais imunizados com p24+flagelina (Figura 12). Tomados juntos, esses resultados sugerem que a flagelina rFliC não apresentou efeito adjuvante para ativação de células T específicas para o antígeno p24.

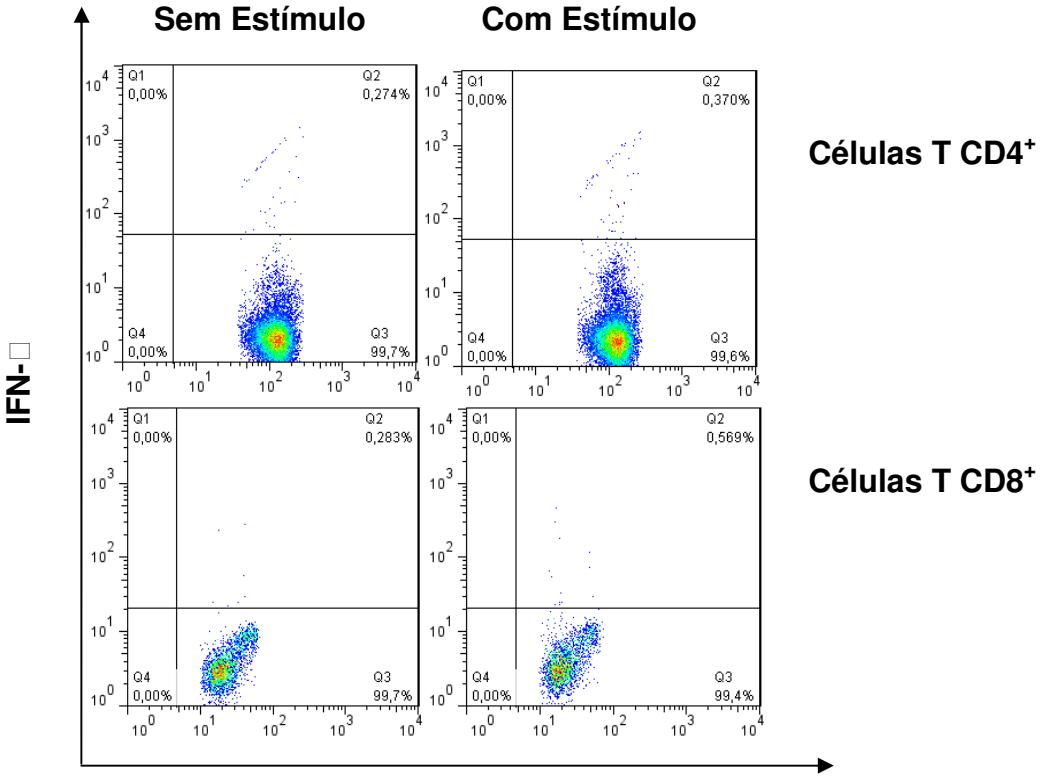


Figura 11 - Análise da ativação de células T p24-específicas em camundongos imunizados pela via s.c. com formulação contendo flagelina como adjuvante. Camundongos BALB/c foram imunizados com 5 doses de PBS, p24, rFliC ou p24+rFliC a intervalos de 2 semanas. A análise da ativação de células T CD4$^+$ e T CD8$^+$ p24-específicas foi realizada 14 dias após a última imunização em células recuperadas do baço desses animais que foram incubadas por 5h na ausência ou presença de estímulo com peptídeos p24$_{197-211}$ e p24$_{197-205}$. As células foram marcadas com anti-CD4$^+$ ou anti-CD8$^+$ conjugado ao Cy e ao FITC, respectivamente. Além disso, as células foram permeabilizadas e marcadas para a produção intracelular de IFN-□ com anticorpo anti-IFN-□conjugado ao PE. Os dados representam o percentual de células T CD4$^+$ ou T CD8$^+$ p24-específicas produtoras de IFN-□ no total de linfócitos T, sendo representativo de um experimento. Os resultados dos grupos imunizados com PBS, p24 ou rFliC e os dados da imunização i.d. não foram apresentados na figura.

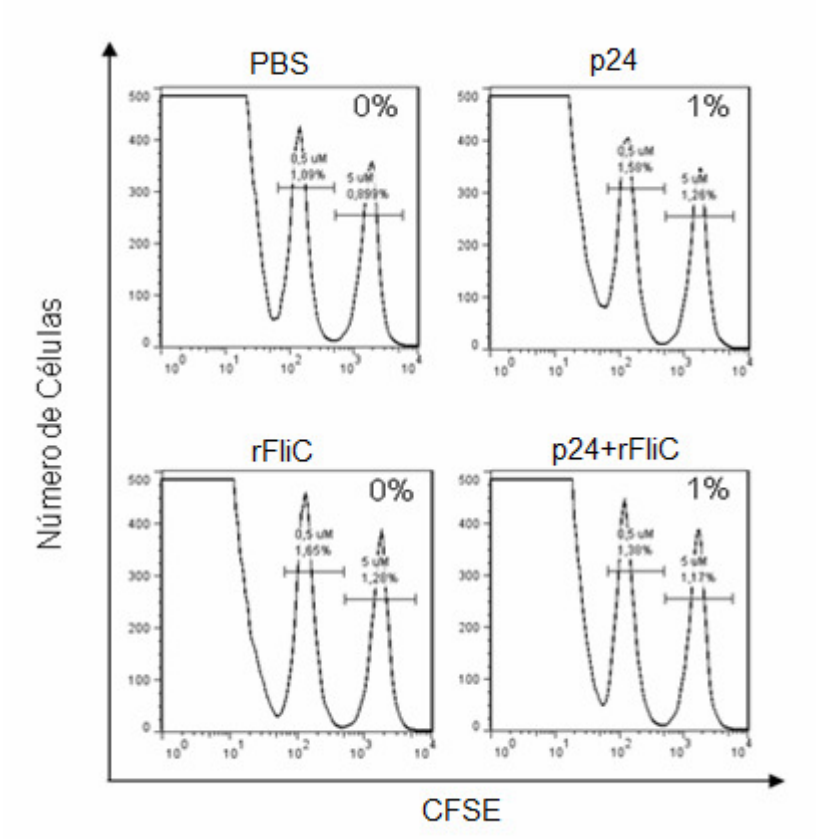


Figura 12 - Citotoxicidade *in vivo* em camundongos imunizados via s.c. com p24 e flagelina como adjuvante. Camundongos BALB/c foram imunizados com 5 doses de cada uma das formulações a intervalos de 2 semanas. 14 dias após a última dose os animais imunizados receberam células do baço de camundongos não imunizados que foram previamente marcadas duas concentrações de CFSE (0,5 µM e 5 µM). Além disso, a população marcada com 5 µM foi pulsada com peptídeo T $CD8^+$ p24-específico. Quantidades equivalentes das duas populações marcadas foram misturadas e inoculadas via i.v. nos animais previamente imunizados. 20h após a inoculação, as células do baço destes animais foram recuperadas e o número de células fluorescentes determinado por citometria de fluxo. O histograma é representativo de um animal de cada grupo e o número do painel representa o percentual de morte celular específica e foi calculado segundo descrito na sessão de material e métodos. Os dados da imunização i.d. não foram apresentados na figura.

Devido a ausência de efeito adjuvante da flagelina para ativação de células T p24-específicas, avaliamos se a incorporação de outro adjuvante poderia ajudar, modulando ou potencializando sua resposta. Para tal avaliação, incorporamos o peptídeo P10 à formulação p24+rFliC. Esse peptídeo foi identificado na glicoproteína de 43 kDa (gp43) do fungo *P. brasilienses* (Pb) pelo grupo do Dr. Travassos e codifica um epítopo T CD4 capaz de se ligar ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC-II) ou ao antígeno leucocitário humano (HLA) de diferentes haplótipos

(TABORDA et al., 1998). Acreditamos que o P10 possa funcionar como adjuvante uma vez que estimula células T $CD4^+$ e promove a diferenciação destas em células T auxiliares do tipo 1 (Th1). Desta forma, a incorporação deste peptídeo à formulação p24+rFliC poderia potencializar a ativação de células T p24-específicas. Assim, grupos de cinco camundongos foram imunizados com 5 doses de PBS, p24, rFliC, p24+P10, ou p24+P10+rFliC pela via s.c. a intervalos de 2 semanas. Após 14 dias da última imunização os baços dos animais foram removidos para análise da ativação de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ por meio da produção de IFN-γ intracelular conforme descrito anteriormente.

Os resultados apresentados na figura 13 mostram que a adição do peptídeo P10 à formulação p24+rFliC promoveu incremento apenas do percentual de células T $CD8^+$ (+0,645%). Esse resultado foi corroborado no ensaio de citotoxicidade *in vivo* para esse grupo, onde também verificamos aumento da percentagem de lise celular (9%) em comparação aos animais imunizados com p24+rFliC (3%), sugerindo, que a combinação P10+flagelina atuou como adjuvante para estimular células T $CD8^+$ específicas (Figura 14). No entanto, a co-administração de P10 com p24, na ausência de rFliC, resultou em contundente aumento do percentual de lise celular (12%) indicando que o peptídeo P10 foi mais eficiente na ativação de CTL do que a flagelina empregada sozinha ou em combinação com o próprio P10. Em conjunto esses resultados mostram que a flagelina promoveu discreta ativação de células T $CD8^+$ específicas para o antígeno p24, quando na formulação foi adicionado o peptídeo P10 que poderia funcionar como um segundo adjuvante. Por outro lado, não verificamos ativação de células T $CD4^+$ específicas mesmo quando o peptídeo P10 foi adicionado na formulação. Além disso, esses resultados mostram que P10 separadamente pode funcionar como adjuvante vacinal para antígenos protéicos co-administrados por via subcutânea.

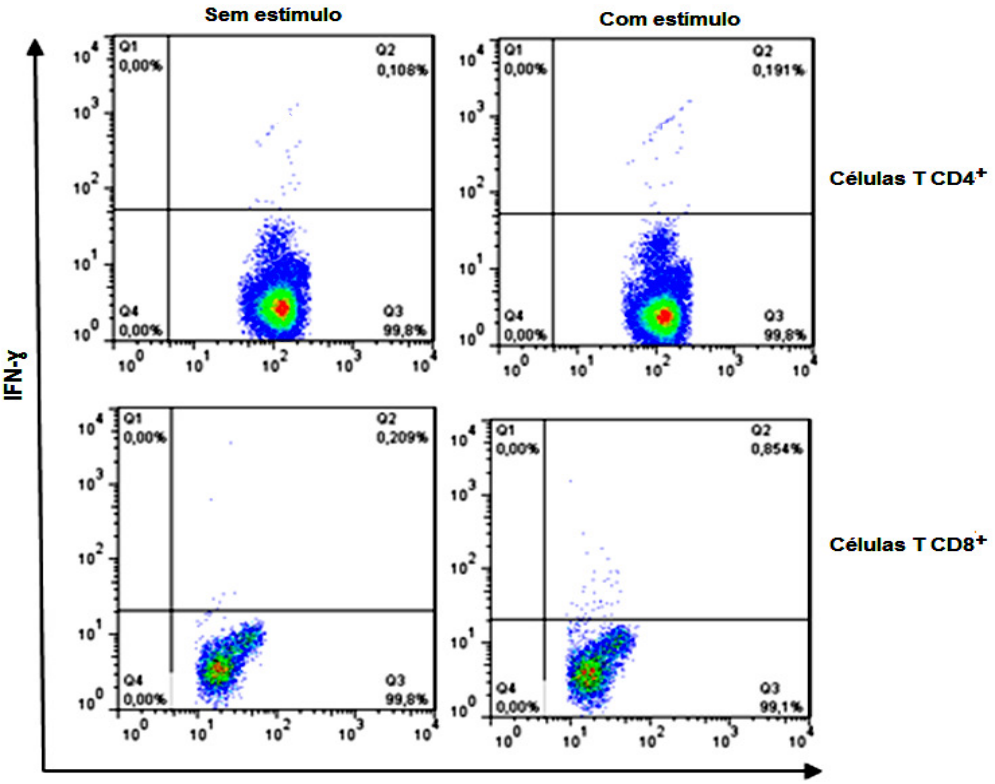


Figura 13 - Análise da ativação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ p24-específicas em camundongos imunizados pela via s.c. com formulação contendo flagelina e peptídeo P10 como adjuvantes. Camundongos BALB/c foram imunizados com 5 doses da mistura p24+P10+rFliC a intervalos de 2 semanas. A análise de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ p24-específicas foram realizadas 14 dias após a última imunização em células recuperadas do baço desses animais que foram incubadas por 5h na ausência ou presença de estímulo com peptídeos $p24_{197-211}$ ou $p24_{197-205}$. As células foram marcadas com anti-$CD4^+$ conjugado com Cy ou anti-$CD8^+$ conjugado com FITC e marcação simultânea com anti-IFN-□ conjugado ao PE. Os dados representam o percentual de células T $CD4^+$ ou T $CD8^+$ p24-específicas produtoras de IFN-□ no total de linfócitos T. Valores referentes a um experimento representativo de dois ensaios feitos.

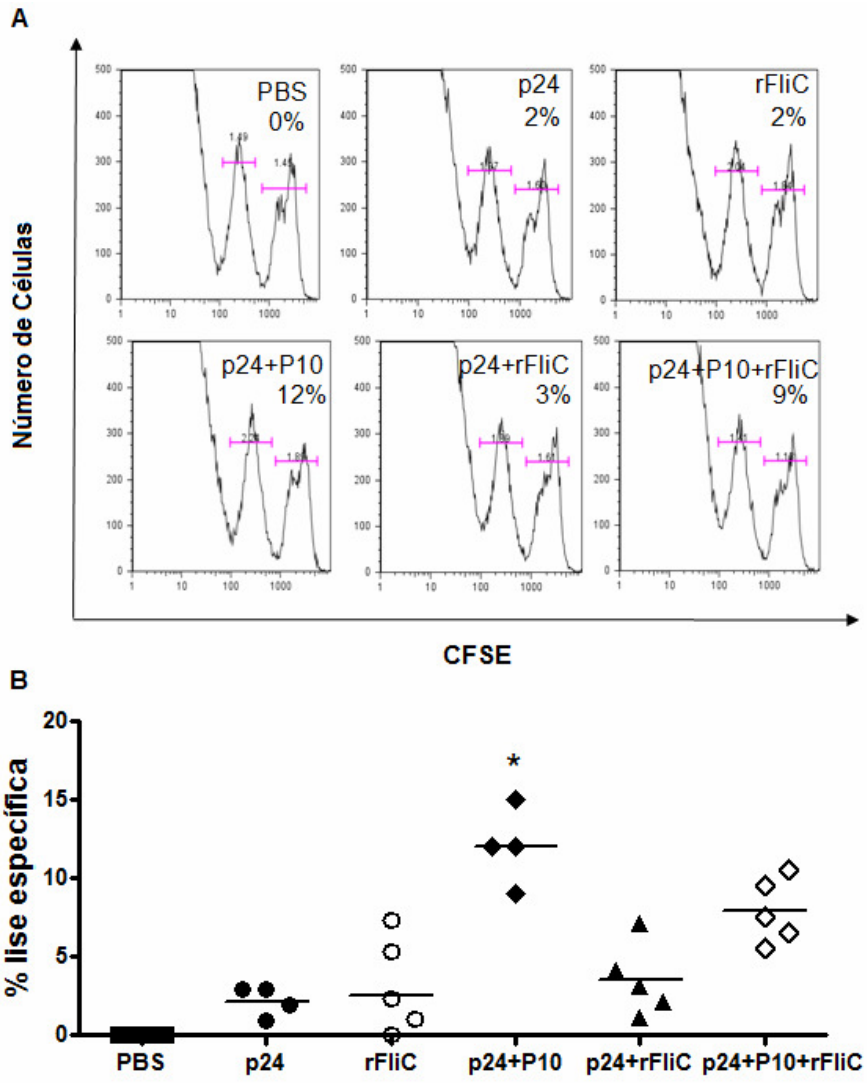


Figura 14 - Citotoxicidade *in vivo* em camundongos imunizados via s.c. com p24, flagelina e peptídeo P10 como adjuvantes. Camundongos BALB/c foram imunizados com 5 doses da mistura p24+P10+rFliC a intervalos de 2 semanas. Duas semanas após a última dose os animais imunizados receberam células do baço de camundongos não imunizados que foram previamente marcadas duas concentrações de CFSE (0,5 µM e 5 µM). Além disso, a população marcada com 5 µM foi pulsada com peptídeo T $CD8^+$ p24-específico e quantidades equivalentes das duas populações foram inoculadas via i.v. nos animais previamente imunizados. 20h após a inoculação, as células do baço destes animais foram recuperadas e o número de células fluorescentes determinado por citometria de fluxo. (A) O histograma é representativo de um animal de cada grupo e o número do painel representa o percentual de morte celular específica e foi calculado segundo descrito na sessão de material e métodos; (B) Percentagem de lise celular específica induzida em cada animal representativa de um experimento com 4-5 animais por grupo. Símbolos denotam diferenças estatísticas (*: $p \leq 0,05$) observadas entre camundongos imunizados com p24vs p24 + adjuvantes.

4.1.1.2 Discussão dos Resultados

O papel de flagelinas de Salmonelas como adjuvante vacinal foi evidenciado em vários estudos que demonstraram sua capacidade de aumentar respostas imunológicas celulares e humorais para antígenos heterólogos (MCSORLEY et al., 2000, 2002; CUADROS et al., 2004; HONKO; MIZEL, 2005; PINO; MARTIN; MICHALEK, 2005; RAVINDRAN; MCSORLEY, 2005; HONKO et al., 2006; BRAGA et al., 2009). Os mecanismos pelos quais a flagelina estimula o sistema imunológico são ainda investigados, mas acredita-se que ocorrem, principalmente, por meio da ligação ao receptor TLR5. A ligação da flagelina ao TLR5 na superfície de DCs promove a ativação e maturação destas, levando ao aumento da expressão de MHC e moléculas co-estimuladoras, bem como secreção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, que são pré-requisitos para ativação de linfócitos T virgens (KAISHO; AKIRA, 2002; TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003; AKIRA; TAKEDA, 2004; APPLEQUIST et al., 2005). Estas observações sugerem que a flagelina apresenta potencial para ativação de células T $CD8^+$. Nesta parte do trabalho investigamos o potencial adjuvante da flagelina recombinante de *Salmonella* (FliC*i*) para ativação de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ específicos para o antígeno p24 do HIV-1. Os resultados apresentados mostram que a flagelina co-administrada ao antígeno p24 promoveu apenas discreta ativação de células T $CD8^+$, enquanto não detectamos ativação de linfócitos T $CD4^+$ específicos.

Embora exista um consenso sobre a capacidade da flagelina promover robusta resposta humoral e ativação de linfócitos T $CD4^+$, seus efeitos na ativação de células T $CD8^+$ permanecem obscuros, sobretudo devido ao baixo número de trabalhos publicados e aos resultados contraditórios geralmente encontrados. Dois estudos não observaram qualquer ativação de células T $CD8^+$ (SCHWARZ et al., 2003; DIDIERLAURENT et al., 2004), enquanto outros quatro estudos demonstraram significante efeito na ativação destas células (CUADROS et al., 2004; HULEATT et al., 2007; BRAGA et al., 2010; BATES et al., 2011). A principal diferença entre esses dois grupos de estudos é a utilização do antígeno em fusão à flagelina nesse último. A ligação física do antígeno à flagelina não é um requerimento para ativação de resposta humoral ou mediada por linfócitos T $CD4^+$ conforme demonstrado em alguns trabalhos (HONKO et al., 2006; LEE et al., 2006; BRAGA et al., 2009). Entretanto, permanece indeterminado se o mesmo é válido para ativação de

linfócitos T $CD8^+$. De fato, trabalhos prévios do grupo demonstraram ativação de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ na ausência de fusão do antígeno, sobretudo para peptídeos sintéticos de 8-15 aminoácidos, que não necessitam de processamento intracelular (BRAGA et al., 2008, 2009, 2010). No entanto, verificamos similar ativação de linfócitos T $CD8^+$ quando o epítopo $CS_{280-288}$ foi fusionado à região central da flagelina, porém utilizando-se quantidade de antígeno bem inferior que aquela onde o antígeno peptídico foi co-administrado à flagelina (BRAGA et al., 2010). Esta observação corrobora a hipótese de que a fusão antígeno-flagelina aumenta a magnitude da resposta imunológica, e, além disso, está em acordo com alguns grupos de pesquisa que apontam a ligação física do antígeno a flagelina como responsável pelo aumento da potência da resposta induzida, por providenciar antígeno e estímulo para a mesma APC (HULEATT et al., 2007; BATES et al., 2011). Recente evidência de que TLR5 funcionaria como um receptor endocítico corrobora estas observações, e sugere que a captura do antígeno é favorecida pela ligação da proteína híbrida ao TLR5 na superfície de DCs (LETRAN et al., 2011). Entretanto, este ano o grupo do Dr. Mizel publicou que a ativação de células T $CD8^+$ *in vitro* e *in vivo* pela proteína de fusão flagelina-OVA é independente da ligação ao TLR5, da ativação de MyD88, e, além disso, de qualquer outro mecanismo dependente da região conservada da flagelina, apontando um novo mecanismo para ação deste adjuvante, onde a flagelina parece favorecer o processamento do antígeno no citoplasma da célula (BATES et al., 2011). Estas observações sugerem que a ausência de ativação de linfócitos T $CD8^+$ específicos para a proteína p24 pode ser conseqüência da inabilidade da flagelina para entregar o antígeno p24 no compartimento intracelular, favorecendo a apresentação via MHC-I para células T $CD8^+$, no entanto não explica a ausência de ativação de células T $CD4^+$.

Virtualmente todos os agonistas de TLRs ativam resposta imunológica com padrão Th1 dominante. No entanto, algumas exceções foram encontradas, onde flagelina promoveu preferencialmente padrão do tipo Th2 (CUNNINGHAM et al., 2004; DIDIERLAURENT et al., 2004; BARGIERI et al., 2008; BRAGA et al., 2009). Acreditamos que a ausência de ativação de linfócitos T $CD8^+$ específicos para o antígeno p24 pode ser reflexo da ativação de um padrão Th2 pela flagelina, o qual privilegia a produção de anticorpos, mas não a ativação e o desenvolvimento de linfócitos T $CD8^+$ e, além disso, corrobora com a ausência de células T $CD4^+$/IFN-γ^+.

A co-administração de P10 e flagelina mostrou de forma contundente mudança da resposta Th2 dominante (induzida pela flagelina) para o padrão Th1 dominante (BRAGA et al., 2009), sugerindo que P10 pode modular a resposta induzida pela flagelina, como também foi demonstrado para quando outros adjuvantes foram administrados junto com flagelina, por exemplo CpG DNA (SFONDRINI et al., 2006; BARGIERI et al., 2008; 2010). Quando P10 foi agregado à formulação p24+rFliC, verificamos incremento da ativação de linfócitos T $CD8^+$ (Figura 13), também corroborado por aumento do percentual de citotoxicidade *in vivo* em animais imunizados com esta formulação (Figura 14). Além disso, a administração de P10 com p24 na ausência de flagelina resultou em maior atividade de CTL com percentual de células T $CD8^+$/IFN-γ^+ similar ao grupo imunizado com p24+P10+rFliC (dados não apresentados), mostrando o efeito de linfócitos Th1 sobre a amplificação da resposta de células T $CD8^+$.

A co-administração de flagelina ao antígeno oferece a vantagem de se dispor de um adjuvante universal, que pode ser utilizado para diferentes antígenos peptídicos ou protéicos sem a necessidade de etapas de clonagem. De fato, alguns trabalhos demonstraram excelentes resultados com o emprego de flagelina co-administrada com diferentes antígenos, realçando a possibilidade de usá-la na forma co-administrada (LEE et al., 1991; MCSORLEY et al., 2002; DIDIERLAURENT et al., 2004; APPLEQUIST et al., 2005; HONKO et al., 2006). No entanto, a maioria dos trabalhos onde a flagelina demonstrou efetividade como adjuvante buscou a produção de anticorpos, revelando que os requerimentos para ativação de resposta humoral são mais simples que aqueles exigidos para ativação de linfócitos T $CD8^+$. Estas observações sugerem que a fusão do antígeno à flagelina pode ser usada como recurso para potencializar o efeito adjuvante para alguns antígenos, sobretudo quando a ativação de linfócitos T $CD8^+$ é desejada.

4.1.2 Avaliação do potencial adjuvante da flagelina FliC*i* para ativação de linfócitos T CD8$^+$ específicos para o antígeno E7 do HPV-16

Um parâmetro experimental de grande relevância em relação ao desenvolvimento de vacinas contra câncer é a capacidade das formulações promoverem a regressão ou mesmo impedir o desenvolvimento de tumores. Neste contexto, linfócitos T CD8$^+$ exercem papel fundamental uma vez que são capazes de reconhecer células tumorais e promover a morte destas por meio de diferentes mecanismos, conseqüentemente, impedindo a progressão do câncer. Assim, nesta parte do trabalho utilizamos o modelo tumoral TC-1 para avaliar a capacidade de a flagelina atuar como adjuvante e promover ativação de células T CD8$^+$ específicas para a oncoproteína E7 do HPV-16.

Células TC-1 expressam constitutivamente duas proteínas do vírus HPV-16 (E6 e E7) de modo similar ao que ocorre com células que foram naturalmente transformadas pelo vírus, sendo esses antígenos utilizados para o desenvolvimento de vacinas contra este tipo de câncer e alvos específicos de CTLs.

Apresentaremos os resultados referentes à purificação da proteína E7 e avaliação do potencial adjuvante da flagelina para indução de resposta citotóxica em modelo de proteção terapêutica contra tumores TC-1 transplantados nos animais. O antígeno E7 foi administrado na forma de peptídeo ou proteína purificada em combinação com flagelina (vacinas de subunidades), ou na forma DNA codificando a informação para produção das duas proteínas (vacinas genéticas). Nossos resultados mostram que a formulação E7+flagelina, administrada na forma de vacinas de subunidades, não promoveu proteção terapêutica total contra tumores TC-1, mas foi capaz de reduzir o número de nódulos tumorais no pulmão dos animais desafiados pela via intravenosa. Por outro lado, a administração de E+ flagelina, na forma de vacina de DNA, promoveu 100% de proteção terapêutica, sugerindo que diferentes mecanismos de ativação imunológica foram induzidos. Em conjuntos nossos dados mostram que a sinalização mediada pela flagelina apresenta efeitos contrastantes em relação ao desenvolvimento do tumor, e sugerem que sua aplicação clínica na imunoterapia de cânceres deve ser precedida pela compreensão detalhada de suas propriedades imunológicas.

4.1.2.1 Descrição dos Resultados

4.1.2.1.1 Expressão e purificação da proteína E7 do HPV-16

No presente estudo utilizamos a proteína E7 do HPV-16 como antígeno modelo para avaliar o efeito adjuvante da flagelina rFliC para ativação de linfócitos T $CD8^+$ específicos para o epítopo imunodominante $E7_{49-57}$. A sequência que codifica para a proteína E7 do HPV-16 foi previamente clonada no sistema de expressão pET28a e o plasmídeo resultante introduzido em *E. coli* BL21(DE3) para posterior expressão (dados não apresentados).

A linhagem albergando o plasmídeo que codifica para E7 foi cultivada em meio LB e quando a DO_{600nm} chegou a 0,8 foi adicionado IPTG (concentração final de 0,5 mM) e a cultura mantida sob agitação por no mínimo 2 h. Alíquotas do cultivo recuperadas antes (canaletas 1) e após (canaletas 2) a adição de IPTG foram coletadas para análise em SDS-PAGE (Figura 15A) e Western Blot (Figura 15B), e o restante do cultivo utilizado para purificação da proteína E7 recombinante por cromatografia de afinidade ao níquel. No entanto, a banda correspondente à proteína foi visualizada apenas fracamente no extrato total da cultura induzida (Figuras 15A, canaleta 2), em qualquer período avaliado acima de 2 h de indução, revelando que não houve diferença na expressão da proteína com incremento do tempo. Além disso, verificamos que a bactéria praticamente parou de crescer quando IPTG foi adicionado sugerindo que E7 apresenta toxicidade para esse hospedeiro. Apesar da fraca expressão, realizamos a purificação de E7 (>90% pureza) conforme apresentado nas figuras 15A e 15B, canaleta 3. Contudo a proteína E7, que tem a massa molecular predita para 8.4 kDa (incluindo as 6 histidinas e alguns aminoácidos do vetor de expressão), demonstrou alteração da mobilidade eletroforética, com uma banda observada de 20 kDa, confirmada por western blot com anticorpo monoclonal anti-E7 (1:4.000) (Figura 15B). Esta observação é consistente com dados anteriores que demonstraram um comportamento de mobilidade anômala para a proteína E7 do HPV-16 quando expressa em sistema procarioto (ARMSTRONG; ROMAN, 1993).

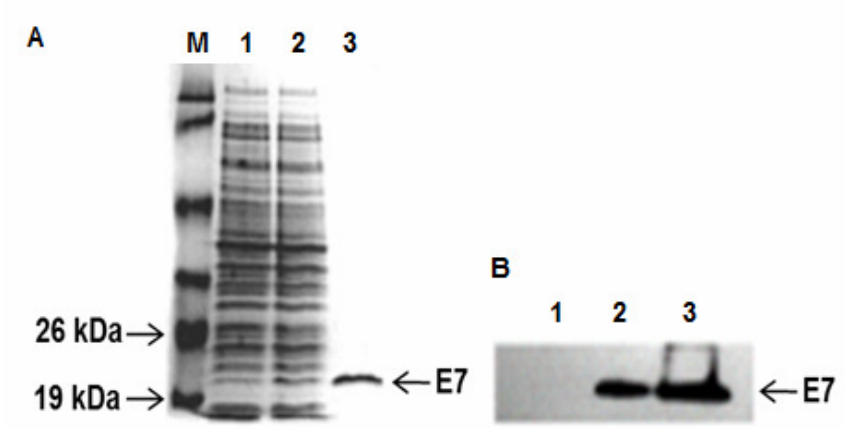


Figura 15 - Expressão e antigenicidade da proteína recombinante E7 do HPV-16. (A) Gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) corado com Coomasie Blue, e (B) imunodetecção em filtro de nitrocelulose utilizando anticorpo monoclonal anti-E7. As canaletas foram carregadas com extrato total da linhagem BL21(DE3) transformada com pETE7. Amostras: Canaletas 1- Extrato total antes da adição de IPTG, 2- Extrato total após 2 h da adição de IPTG, e 3-proteína E7 purificada por cromatografia de afinidade ao níquel. M- Padrão de massa molecular (invitrogen).

4.1.2.1.2 Avaliação do efeito anti-tumoral terapêutico de formulações vacinais que empregaram rFliC como adjuvante para a proteína E7 do HPV-16

Com o objetivo de avaliar o efeito adjuvante da flagelina rFliC para ativação de células T $CD8^+$ E7-específicas, realizamos ensaios de proteção terapêutica no qual camundongos C57BL/6 foram primeiramente desafiados com 7,5 $x10^4$ células TC-1 pela via subcutânea e, subsequentemente, imunizados por esta mesma via, em local próximo ao da inoculação de células TC-1. Grupos de oito camundongos receberam 4 doses de PBS, E7(20 µg), rFliC (5 µg) ou a combinação E7+rFliC administradas a intervalos de uma semana pela via subcutânea. O protocolo de imunização foi iniciado dois dias após o desafio e os animais observados quanto ao desenvolvimento de tumor subcutâneo durante 50 dias ou até que o tumor atingisse o diâmetro de 1,5 cm, momento em que foram submetidos à eutanásia. A formulação E7+rFliC, bem como os controles, não foram capazes de induzir resposta protetora contra o tumor TC-1 nos animais imunizados (Figura 16). Além disso, observou-se crescimento precoce do tumor no grupo imunizado apenas com rFliC. Estes dados mostram que mesmo após administração de 4 doses da formulação E7+rFliC, a flagelina não promoveu qualquer resposta efetora capaz de

impedir ou retardar o crescimento do tumor nos animais imunizados terapêuticamente.

Apesar do modelo de desafio subcutâneo ser amplamente utilizado, ele fornece resultados apenas qualitativos uma vez que correlaciona a proteção com ausência de tumor e determina que animais que apresentarem tumor persistente em qualquer período sejam considerados desprotegidos. Outro modelo de desafio tumoral que pode ser utilizado para avaliação de formulações vacinais contra tumores induzidos por HPV-16 é o modelo de desafio intravenoso com células TC-1. Quando inoculadas pela via i.v., as células TC-1 migram para os pulmões onde se desenvolvem formando nódulos tumorais semelhantes a vesículas e que podem ser quantificados neste órgão, em média, 40 dias após o desafio. Além disso, este modelo de desafio nos permite observar a morfologia dos nódulos e do tecido pulmonar e inferir algumas correlações além da constatação da presença ou ausência do tumor.

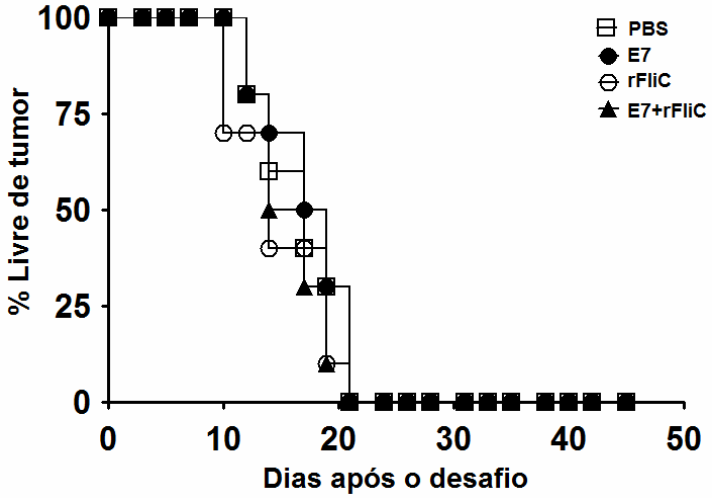


Figura 16 - Ensaio de proteção terapêutica em camundongos desafiados com células TC-1 via s.c. e imunizados com 4 doses de formulações contendo a proteína E7 e flagelina como adjuvante. Camundongos C57BL/6 foram inoculados com 7,5x10^4 células TC-1 e após dois dias, imunizados via s.c. com cada uma das formulações: PBS, E7, rFliC ou E7+rFliC. O desenvolvimento do tumor foi acompanhado por 50 dias ou até que atingisse 1,5 cm de tamanho, circunstância na qual os animais foram submetidos à eutanásia.

Desse modo, realizamos um novo experimento onde grupos de cinco a seis camundongos C57BL/6 foram desafiados com 1,0 x10^4 células TC-1 via intravenosa (através do plexo retro-orbital). Além disso, baseados em resultados prévios de Braga et al. (2009, 2010) que demonstraram o potencial da flagelina de *Salmonella*

Typhimurium para ativação de linfócitos T CD4$^+$ e T CD8$^+$ no pulmão de animais imunizados pela via intranasal, modificamos a via de imunização utilizada anteriormente. Logo, dois dias após o desafio, iniciamos o protocolo de imunização com a administração das formulações descritas anteriormente pela via intranasal. Foram administradas 3 doses de cada formulação a intervalos de uma semana, em dois experimentos independentes. Com esta modificação esperávamos que a resposta local induzida pela formulação E7+rFliC fosse capaz de estimular linfócitos T CD8$^+$ e mediar proteção contra o desenvolvimento do tumor no pulmão, mas, conforme apresentado na figura 17A, três doses desta formulação foi capaz de promover apenas discreta diminuição do número de nódulos tumorais comparada ao grupo que recebeu PBS, sem apresentar diferença estatítica com animais do grupo imunizado com E7 na ausência de adjuvante. Além disso, observamos que o grupo imunizado com rFliC apresentou número e tamanho dos nódulos tumorais maiores que aqueles encontrados nos demais grupos e que refletiram no aumento dos pesos dos pulmões destes animais como apresentado na figura 17B, embora sem apresentar diferenças estatísticas com os os demais grupos.

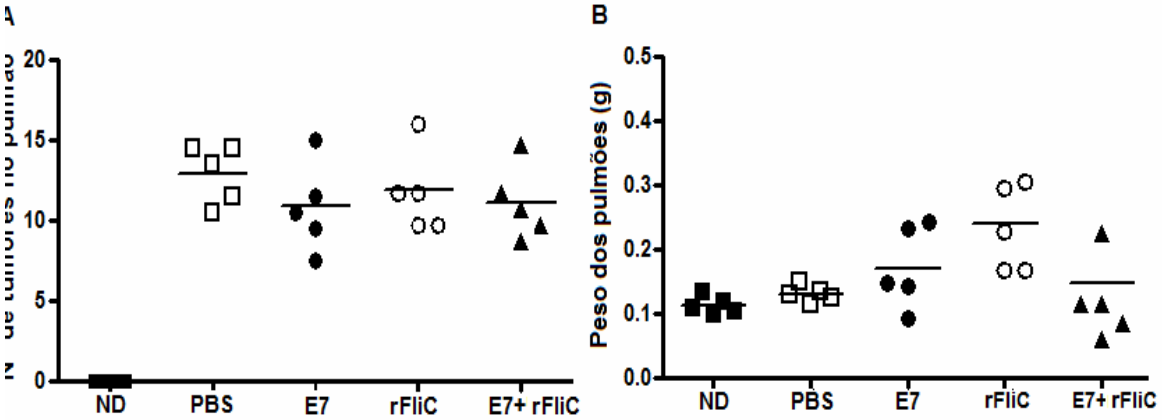


Figura 17 - Ensaio de proteção terapêutica em camundongos desafiados com células TC-1 pela via i.v. e imunizados com 3 doses de formulações contendo a proteína E7 e flagelina como adjuvante. (A) Número de nódulos tumorais em cada animal; (B) Peso dos pulmões retirados de cada animal. Camundongos C57BL/6 foram inoculados com 10^4 células TC-1 e após dois dias iniciado o esquema de imunização de 3 doses de cada uma das formulações: PBS, E7, rFliC ou E7+rFliC administradas pela via i.n. a intervalos de uma semana. Um grupo adicional foi imunizado com PBS e não recebeu células TC-1(ND). Após 40 dias do desafio os animais foram submetidos à eutanásia e os pulmões removidos para análise.

O ensaio descrito acima foi repetido, porém, o número de doses aumentado. Como podemos observar, a administração de 4 doses da formulação E7+rFliC promoveu diminuição do número de tumores encontrado nestes animais comparado aqueles imunizados com PBS ou demais controles imunizados com E7 ou rFliC (Figura 18A), embora sem apresentar diferenças estatísticamente significantes. Por outro lado, verificamos discreto aumento do número de tumores e da média de peso dos pulmões no grupo imunizado apenas com rFliC, sugerindo que a presença de flagelina sem antígeno exógeno promoveu o desenvolvimento do tumor, embora não seja possível realizar uma comparação direta entre os dois experimentos (Figura 17A x 18A) visto que existem diferenças no número de nódulos tumorais apresentados nos animais dos grupos controles, já que os ensaios foram realizados em momentos diferentes. Além disso, não verificamos diferenças estatísticamente significantes no tamanho dos tumores nos pulmões dos grupos PBS e E7+rFliC, sugerindo que a administração de uma dose adicional da formulação E7+rFliC foi capaz de aumentar a proteção anteriormente visualizada (Figura 18B). Em conjunto esses dados mostram que formulações contendo flagelina não foram capazes de promover 100% de proteção terapêutica contra o desenvolvimento de tumores TC-1, mas promoveram redução do número de nódulos tumorais quando combinado ao antígeno E7 e administrada no esquema de 4 doses.

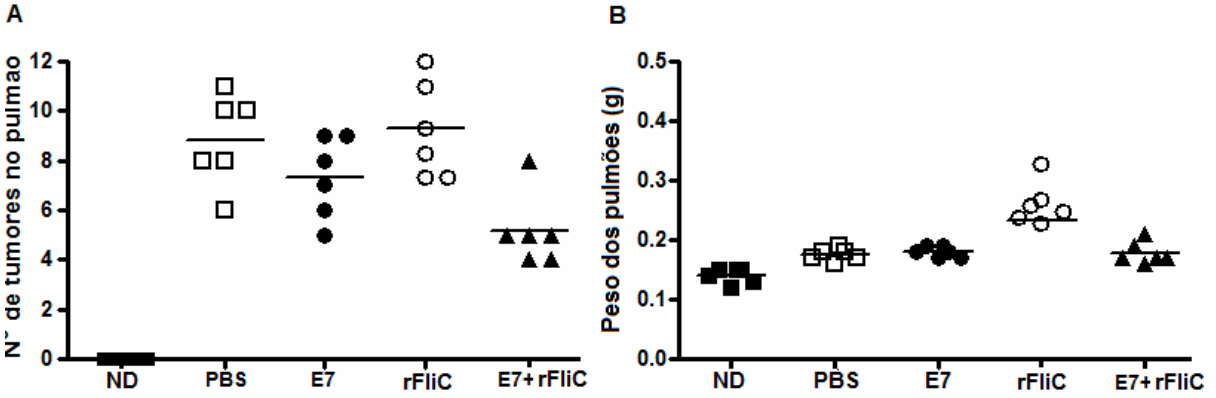


Figura 18 - Ensaio de proteção terapêutica em camundongos desafiados com células TC-1 pela via i.v. e imunizados com 4 doses de formulações contendo a proteína E7 e flagelina como adjuvante. (A) Número de nódulos tumorais em cada animal; (B) Peso dos pulmões retirados de cada animal. Camundongos C57BL/6 foram inoculados com 10^4 células TC-1 e após dois dias iniciado o esquema de imunização de 4 doses com cada uma das formulações: PBS, E7, rFliC ou E7+rFliC administradas a intervalos de uma semana pela via intranasal. Um grupo adicional foi imunizado com PBS e não recebeu células TC-1(ND). Após 40 dias do desafio os animais foram submetidos à eutanásia e os pulmões removidos para análise.

Os pulmões dos animais foram utilizados para dosagem de citocinas produzidas localmente (Figura 19). Para este fim, o pulmão de cada animal foi pesado e triturado em 1 mL de PBS contendo inibidores de proteases, e após centrifugação, o sobrenadante foi separado e utilizado para detecção das citocinas IFN-ɣ, IL-4, IL-10 e TNF-α por ELISA. Conforme apresentado na figura 19, a administração destas formulações promoveu algumas variações no perfil de citocinas produzidas no pulmão. Podemos observar que os animais tratados com formulações contendo flagelina (rFliC ou E7+rFliC) produziram menor quantidade de citocinas do tipo Th1 (IFN-ɣ e TNF-α) enquanto produziram os mais altos níveis da citocina reguladora IL-10, comparando a produção destas nos animais imunizados com PBS e E7. Por outro lado, a produção de IL-4, característica do padrão Th2, foi mais diversificada entre os grupos, mas animais imunizados com PBS e rFliC apresentaram maior produção que animais imunizados com E7 ou E7+rFliC. Além disso, verificamos que os grupos imunizados com PBS produziram as maiores quantidades das citocinas IL-4, IFN-ɣ e TNF-α, sugerindo que estas são primariamente estimuladas pelas células TC-1 durante o desenvolvimento tumoral, e que sua presença não compromete o desenvolvimento do tumor, mas a prevalência de uma delas, como a IL-10, pode deslocar o equilíbrio favorecendo o crescimento do tumor, como observamos no grupo imunizado com rFliC que apresentou maior número de nódulos tumorais (Figura 18A) e IL-10 (Figura 19C). Observamos ainda que os grupos que apresentaram a menor produção de IL-4 (E7 e E7+rFliC) ($p<0,05$) foram aqueles com menor número de nódulos tumorais, sugerindo que essa citocina tem importante papel no desenvolvimento do tumor. Em conjunto, estes dados sugerem que a predominância de citocinas do tipo Th1 (IFN-ɣ e TNF-α) pode ser suficiente para controlar o desenvolvimento do tumor conforme verificamos no grupo imunizado com a proteína E7 sem adjuvante (Figura 19A e 19C) e, além disso, que a presença de flagelina na formulação tendencia a produção de citocinas para o padrão do tipo Th2 que favorece o desenvolvimento do tumor, mas a combinação E7+rFliC, promove uma resposta Th2/Th1 mais balanceada e oferece resistência ao desenvolvimento do tumor (Figura 19E).

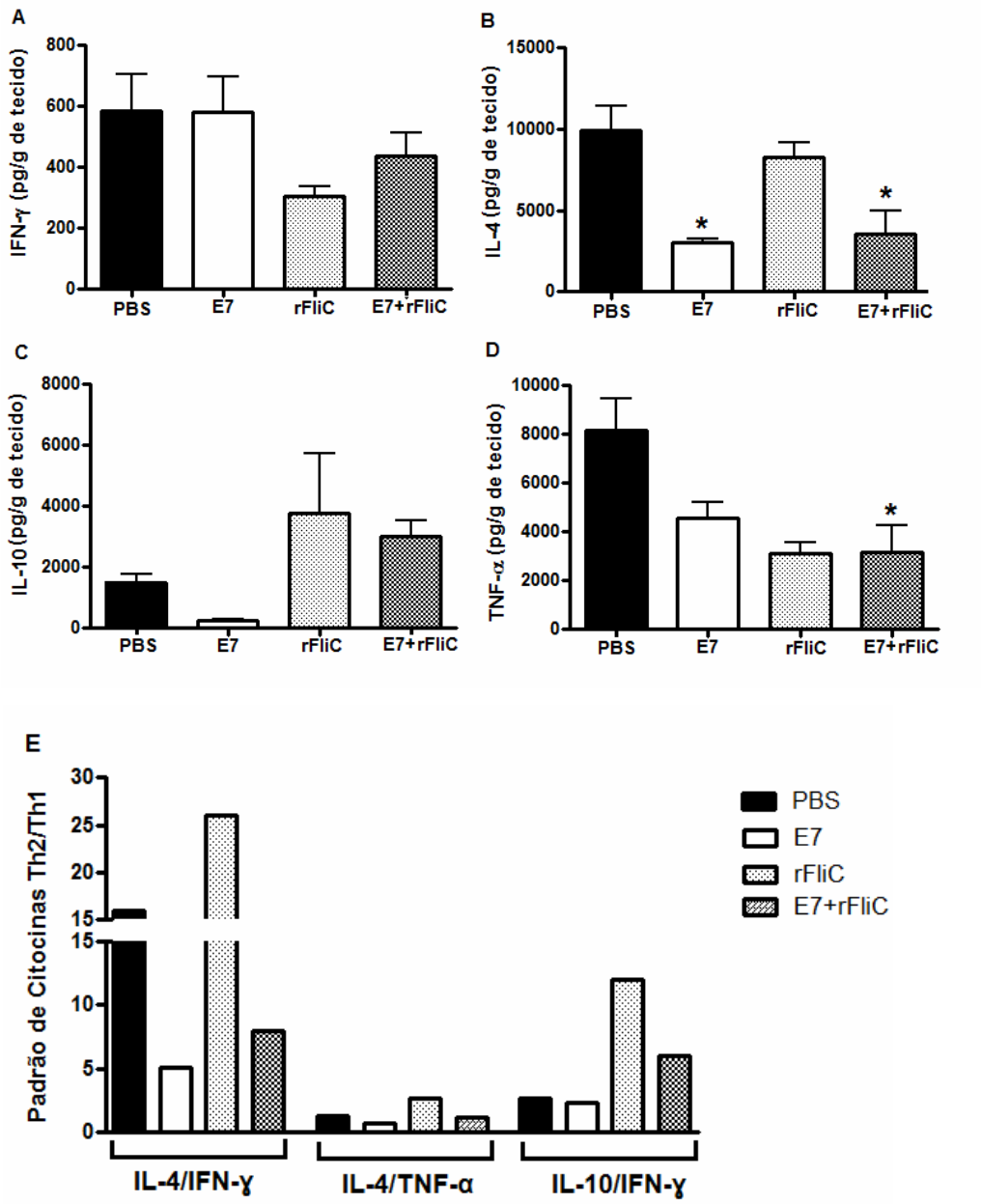


Figura 19 - Detecção de citocinas nos pulmões de camundongos desafiados com células TC-1 pela via i.v. e imunizados com 4 doses de formulações contendo a proteína E7 e flagelina como adjuvante. Camundongos C57BL/6 foram inoculados com 10^4 células TC-1 e após dois dias iniciado o esquema de imunização de 4 doses com cada uma das formulações: PBS, E7, rFliC ou E7+rFliC administradas a intervalos de uma semana pela via intranasal. Um grupo adicional foi imunizado com PBS e não recebeu células TC-1(ND), e os valores de citocinas detectadas neste grupo foram descontados dos demais grupos. Após 40 dias do desafio os animais foram submetidos à eutanásia e os pulmões removidos para análise das citocinas (A) IFN-□; (B) IL-4; (C) IL-10; (D) TNF-α; e (E) determinação do padrão de citocinas resultante Th2/Th1. Os símbolos indicam diferenças estatísticamente significantes (*: p<0,05) com relação ao grupo PBS.

4.1.2.1.3 Avaliação das respostas imunológicas induzidas por formulações vacinais que empregaram rFliC como adjuvante para a proteína E7 do HPV-16

Para avaliar as respostas imunológicas induzidas pela formulação E7+rFliC sem a interferência das células TC-1, grupos de quatro camundongos C57BL/6 foram imunizados com 4 doses de cada formulação no esquema de imunização anterior e duas semanas após a última dose da vacina, células do sangue e do baço destes animais foram coletadas para análise da ativação de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos. Após estímulo *in vitro* com peptídeo $E7_{49-57}$ MHC classe I restrito (K^b) as células foram marcadas simultaneamente com anticorpos anti-CD8 e anti-IFN-ɣ, mas não verificamos a presença de células T $CD8^+$/IFN-$ɣ^+$ específicas em nenhum dos grupos experimentais. Além disso, o ensaio ELISPOT, realizado a partir das células do baço destes animais, também não revelou a presença de células secretoras de IFN-ɣ. No entanto, a dosagem de citocinas no pulmão dos animais mostrou produção superior de citocinas Th1 (IFN-ɣ e TNF-α) em relação aos grupos imunizados com E7 ($p<0,05$) e E7+rFliC ($p<0,05$ e $p<0,01$), enquanto a produção foi apenas discreta no grupo imunizado com flagelina sem antígeno (Figura 20A e 20C). Além disso, os grupos imunizados com E7 ou E7+rFliC também apresentaram maior produção de IL-4 que o grupo imunizado com rFliC (Figura 20B), mas o padrão de citocinas resultante, determinado pela taxa de produção IL-4/IFN-ɣ, apresentou maior tendência para o padrão Th1 nesses grupos do que naquele imunizado com rFliC (Figura 20D). Em adição, IL-10 não foi detectada no pulmão de nenhum dos animais imunizados. Em conjunto esses resultados sugerem que a administração de flagelina na ausência do antígeno E7 induz a produção de citocinas que caracterizam uma resposta imunológica do tipo Th2.

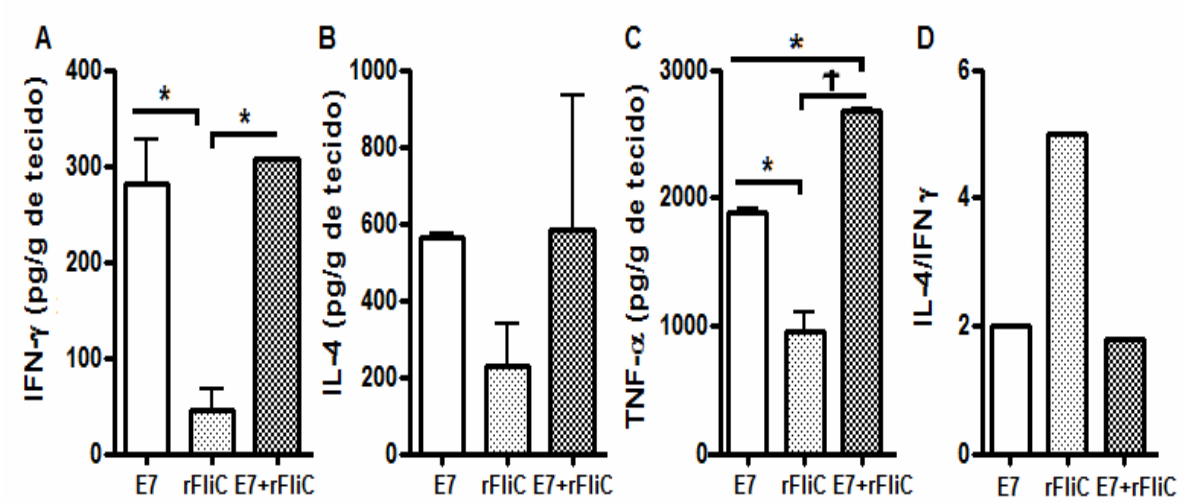


Figura 20 - Detecção de citocinas nos pulmões de camundongos imunizados com 4 doses de formulações contendo a proteína E7 e flagelina como adjuvante. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com 4 doses de cada uma das formulações: PBS, E7, rFliC ou E7+rFliC administradas a intervalos de uma semana pela via intranasal. Após 14 dias da última imunização os animais foram submetidos à eutanásia e os pulmões removidos para dosagem de citocinas (A) IFN-□; (B) IL-4; (C) TNF-α; e (D) taxa IL-4/IFN-□ observada nos diferentes grupos de imunização. Os valores de citocinas detectados nos animais imunizados com PBS foram descontados dos demais grupos. Os símbolos indicam diferenças estatisticamente significantes *: $p<0,05$ e □: $p<0,01$ com relação ao grupo imunizado com rFliC.

4.1.2.1.4 Avaliação do efeito anti-tumoral profilático-terapêutico de formulações vacinais que empregaram rFliC como adjuvante para a proteína E7 do HPV-16

Para avaliar se a inoculação prévia de flagelina poderia aumentar a atividade anti-tumoral induzida pela formulação E7+rFliC, imunizamos grupos de cinco camundongos com 5 doses de PBS, E7, rFliC ou a combinação E7+rFliC pela via i.n. a intervalos de uma semana, em um esquema de imunização que denominamos de profilático-terapêutico, pois o desafio foi realizado durante a imunização, ou seja, os animais foram desafiados com 10^4 células TC-1 pela via intravenosa no mesmo dia que receberam a terceira dose das vacinas. Após 40 dias do desafio os pulmões dos animais foram removidos para contagem do número de nódulos tumorais. Como podemos observar na figura 21A, nenhuma das formulações promoveu redução do número de tumores no pulmão dos animais. Na verdade observamos aumento do número de tumores em todos os grupos, inclusive no grupo imunizado com E7+rFliC, quando comparado ao grupo imunizado apenas com PBS. Em adição, o grupo imunizado com rFliC apresentou o mais elevado número de nódulos tumorais ($p<0,001$) e peso dos pulmões ($p<0,001$), embora nenhuma diferença significativa tenha sido observada na média do tamanho dos tumores desse grupo comparado com os grupos que receberam E7 ou E7+rFliC (Figura 21B). Além disso, os tumores no pulmão de animais imunizados com PBS e desafiados com TC-1 foram bem menores que aqueles dos animais imunizados com qualquer formulação vacinal. Estes resultados sugerem um favorecimento do desenvolvimento do tumor, quando empregado o esquema de imunização profilático-terapêutico.

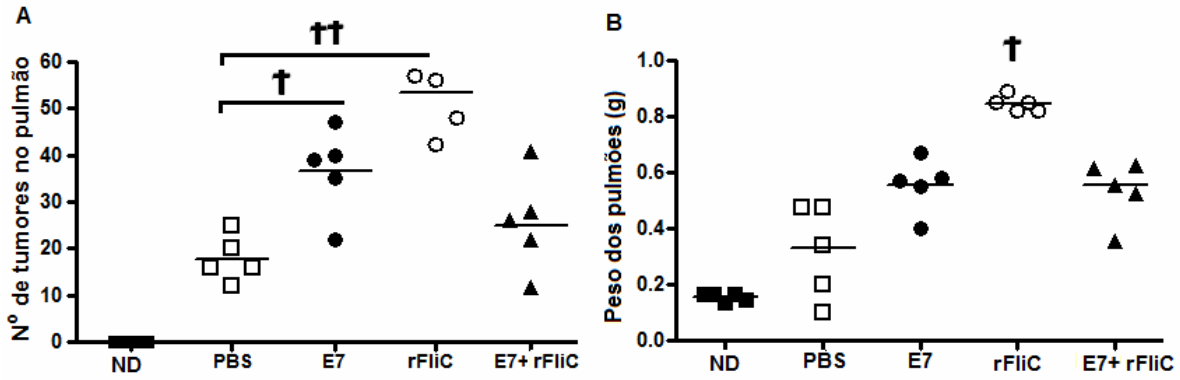


Figura 21 - Ensaio de proteção profilático-terapêutica em camundongos desafiados com células TC-1 pela via i.v. e imunizados com 5 doses de formulações contendo a proteína E7 e flagelina como adjuvante. (A) Número de nódulos tumorais em cada animal; (B) Peso dos pulmões retirados de cada animal. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com 5 doses de PBS, E7, rFliC ou a combinação E7+rFliC administradas a intervalos de uma semana pela via intranasal. Os animais foram desafiados com 10^4 células TC-1 pela via intravenosa no mesmo dia da terceira dose. Um grupo adicional foi imunizado com PBS e não recebeu células TC-1(ND) e os valores de citocinas produzidas por este grupo foram descontados dos demais grupos. Após 40 dias do desafio os animais foram submetidos à eutanásia e os pulmões removidos para análise. Os símbolos indicam diferenças estatisticamente significantes □: $p<0,01$ e □□: $p<0,001$ com relação ao grupo PBS.

4.1.2.1.5 Avaliação do efeito anti-tumoral terapêutico de formulações vacinais que empregaram rFliC como adjuvante para o peptídeo T $CD8^+$ da proteína E7 do HPV-16

Resultados prévios publicados por nosso grupo estabeleceram o efeito adjuvante da flagelina frente a peptídeos sintéticos (BRAGA et al., 2009; 2010), onde demonstramos que a administração de flagelina com peptídeos codificando epítopos para células T foi capaz de promover ativação de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ específicos para o peptídeo P10 e CS, respectivamente, após co-administração por vias de mucosa e parenteral. Esse conceito foi aplicado na avaliação terapêutica de formulações anti-tumor contendo flagelina como adjuvante para o peptídeo T $CD8^+$ da proteína E7. Grupos de seis camundongos foram desafiados com 10^4 células TC-1 pela via i.v. e após dois dias iniciado o esquema de imunização nasal com 4 doses de PBS, peptídeo E7 25 µg (pepE7), rFliC 5 µg ou a combinação pepE7+rFliC administradas semanalmente pela via i.n. A análise dos pulmões dos animais após 40 dias do desafio revelou diminuição do número de nódulos tumorais no grupo

imunizado com pepE7+rFliC comparado aos demais grupos, embora esta diferença não seja estatisticamente significante (Figura 22A). Além disso, o tamanho dos nódulos (dados não apresentados) e a média dos pesos dos pulmões desses animais não apresentou diferenças em relação aos demais grupos desafiados, exceto pelo grupo imunizado apenas com o peptídeo E7 que apresentou a maior média de peso dos pulmões sem alteração correspondente no número de nódulos (Figura 22B). Esses resultados sugerem que a co-administração de flagelina e peptídeo E7 promoveu parcial efeito anti-tumoral terapêutico e atenuou o desenvolvimento de tumores.

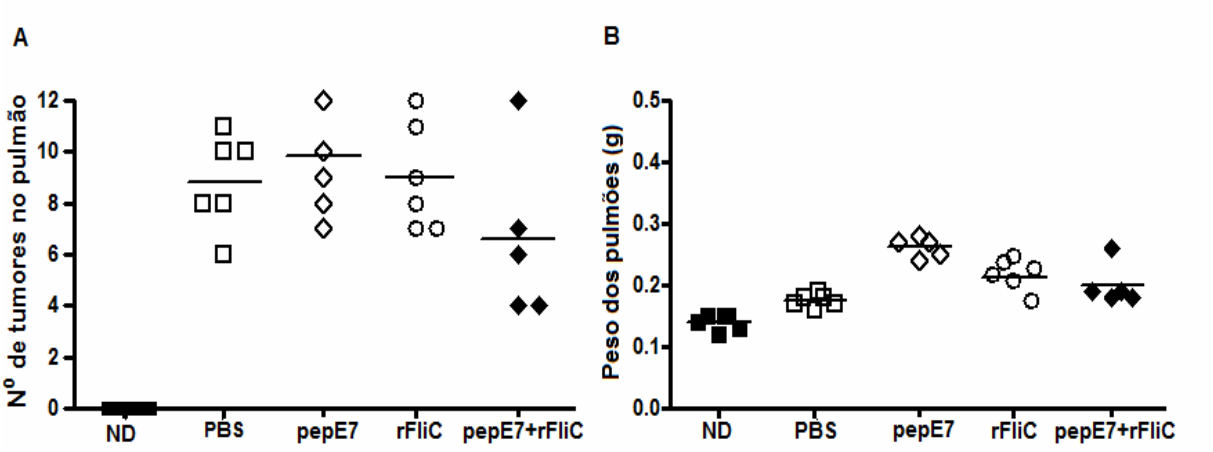


Figura 22 - Ensaio de proteção terapêutica em camundongos desafiados com células TC-1 pela via i.v. e imunizados com 4 doses de formulações contendo o peptídeo T CD8 da proteína E7 (pepE7) e flagelina como adjuvante. (A) Número de nódulos tumorais em cada animal; (B) Peso dos pulmões retirados de cada animal. Camundongos C57BL/6 foram inoculados com 10^4 células TC-1 e após dois dias iniciado o esquema de imunização de 4 doses com cada uma das formulações: PBS, pepE7, rFliC ou pepE7+rFliC administradas a intervalos de uma semana pela via intranasal. Um grupo adicional foi imunizado com PBS e não recebeu células TC-1(ND). Após 40 dias do desafio os animais foram submetidos à eutanásia e os pulmões removidos para análise.

4.1.2.1.6 Avaliação do efeito anti-tumoral terapêutico de formulações vacinais que empregam rFliC e peptídeo P10 como adjuvantes para a proteína E7 do HPV-16

Com o objetivo de aumentar o efeito anti-tumoral terapêutico obtido com rFliC como adjuvante, incorporamos o peptídeo P10 às formulações E7+rFliC e pepE7+rFliC. Em trabalho prévio realizado pelo grupo verificamos desvio do padrão de citocinas gerado pelo estímulo com flagelina (normalmente Th2>Th1) quando o peptídeo P10 foi incorporado à formulação, passando para o perfil Th1 dominante, o que resultou na proteção de camundongos BALB/c contra PCM experimental (BRAGA et al., 2009). Este peptídeo poderia funcionar como um poderoso imunomodulador da resposta induzida pela flagelina e beneficiar a geração de CTLs uma vez que promove ativação de linfócitos T $CD4^+$ do tipo Th1 que auxiliam no desenvolvimento e manutenção destes.

Para confirmar a imunomodulação do P10 sobre a resposta induzida pela flagelina em camundongos C57BL/6, grupos de quatro animais foram imunizados com 4 doses semanais de PBS; peptídeo P10 20 µg, rFliC 5 µg; ou a combinação P10+rFliC administradas pela via intranasal e 14 dias após a última imunização, o pulmão dos animais foi removido para dosagem de citocinas. A análise da produção de IFN-ɣ mostra claramente que a administração de P10 com flagelina promoveu efeito sinérgico na produção de IFN-ɣ, aumentando a produção dessa citocina em cerca de 7X e 2,3X comparado a administração de flagelina ou P10, respectivamente (Figura 23A). Por outro lado, não observamos efeito sinérgico para produção de IL-4 quando P10 foi administrado com flagelina (Figura 23B). Embora a produção de IL-4 tenha sido maior no grupo que recebeu P10+rFliC (2,4X) comparado ao grupo que recebeu rFliC, o padrão de citocinas resultante IL-4/IFN-ɣ indica que a resposta apresentada pela inoculação de P10 com flagelina é do tipo Th1 dominante, enquanto aquela induzida pela administração de flagelina apenas é Th2 dominante (Figura 23C). Em adição, a produção de TNF-α foi similar aquela observada para a produção de IFN-ɣ (dado não apresentado). Esses resultados corroboram observações anteriores onde a inoculação de P10 parece modular e potencializar a resposta imunológica induzida pela flagelina no pulmão de animais, favorecendo o padrão de resposta do tipo Th1 (BRAGA et al., 2009).

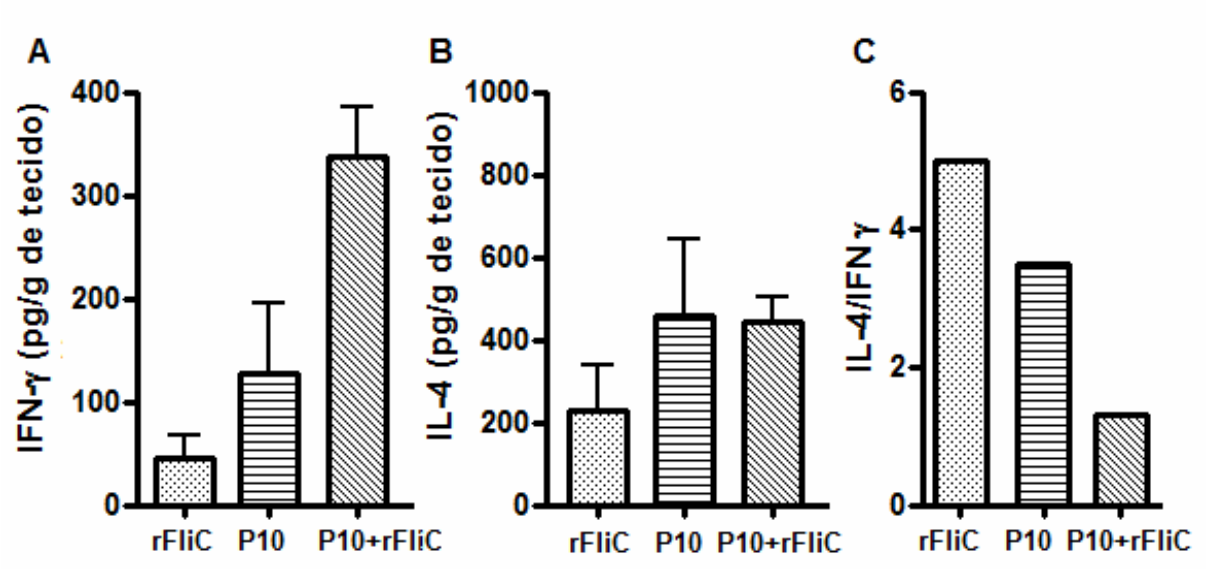


Figura 23 - Detecção de citocinas nos pulmões de camundongos imunizados com 4 doses de formulações contendo o peptídeo P10 e flagelina como adjuvante. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com 4 doses de cada uma das formulações: PBS, rFliC, peptídeo P10 e P10+rFliC administradas a intervalos de uma semana pela via intranasal. Após 14 dias da última imunização os animais foram submetidos à eutanásia e os pulmões removidos para dosagem de citocinas (A) IFN-□; (B) IL-4; (C) TNF-α; e (D) taxa IL-4/IFN-□ observada nos diferentes grupos de imunização. Os valores de citocinas detectado nos animais imunizados com PBS foram descontados dos demais grupos.

Uma vez que o efeito imunomodulador do P10 sobre a flagelina foi confirmado, avaliamos a hipótese de que sua incorporação à formulação E7+rFliC ou pepE7+rFliC poderia aumentar o efeito antitumoral terapêutico dessas formulações. Grupos de cinco camundongos foram desafiados com 10^4 células TC-1 pela via intravenosa e dois dias após imunizados com 4 doses semanais de PBS, E7 20 µg, pepE7 25 µg, P10 20 µg, rFliC 5 µg; ou as combinações E7+rFliC, E7+P10, pepE7+P10 ou E7+P10+rFliC administradas pela via intranasal. Após 40 dias do desafio, a análise dos pulmões desses animais revelou que a incorporação do peptídeo P10 exerceu efeito benéfico de redução do número de nódulos apenas nos grupos onde este foi co-administrado à proteína E7 ou E7+rFliC, sendo o efeito neste último grupo menor (Figura 24A), porém sem diferenças estatisticamente significativas.

A co-administração de P10 com peptídeo E7 não resultou em aumento do efeito antitumoral visualizado até o momento quando comparado a qualquer outra formulação vacinal utilizada, embora nestes animais o número de nódulos tumorais tenha sido inferior ao grupo tratado com PBS ou demais controles isolados.

Curiosamente, observamos que nos animais tratados apenas com peptídeo P10 a quantidade de nódulos tumorais foi superior ao encontrado nos demais grupos e os tumores estavam bem mais desenvolvidos (dados não apresentados) o que refletiu no aumento dos pesos dos pulmões (Figura 24B). Em conjunto estes resultados sugerem que a incorporação de P10 à formulações contendo flagelina como adjuvante exerceu efeito anti-tumoral sinérgico e que esse efeito foi dependente de um componente específico do tumor.

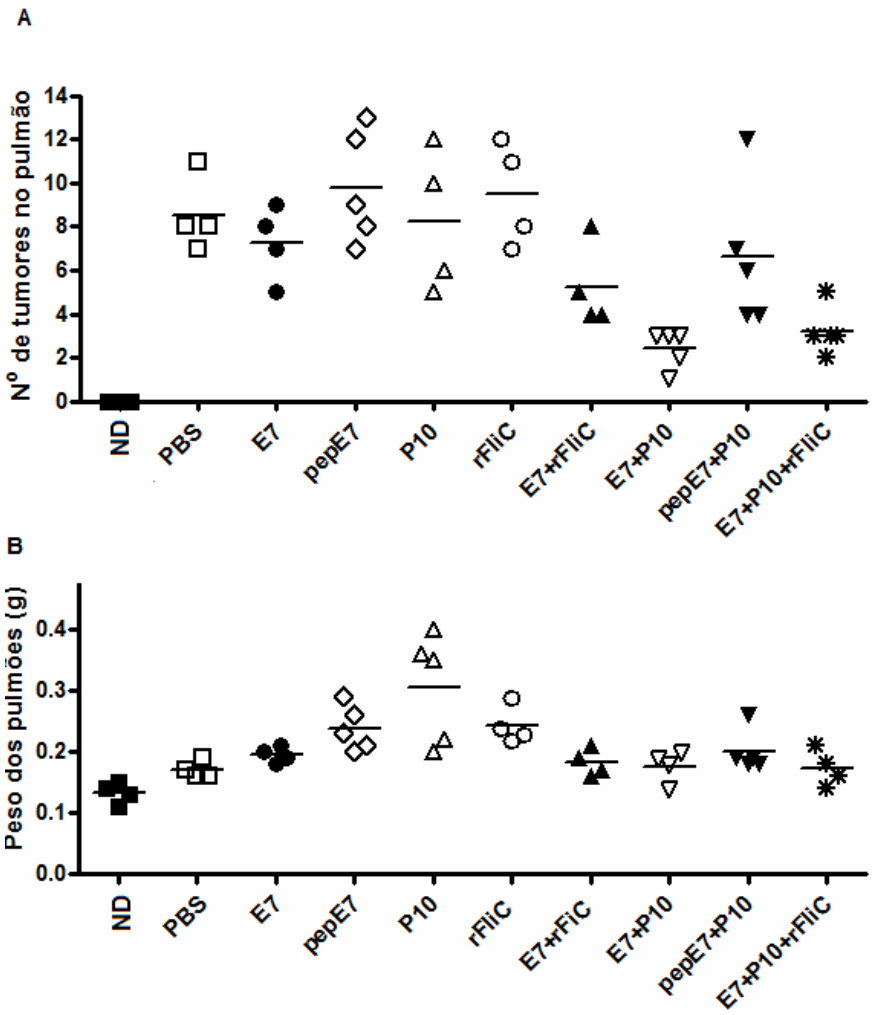


Figura 24 - Ensaio de proteção terapêutica em camundongos desafiados com células TC-1 pela via i.v. e imunizados com 4 doses de formulações contendo flagelina e peptídeo P10 como adjuvantes. (A) Número de nódulos tumorais em cada animal; (B) Peso dos pulmões retirados de cada animal. Camundongos C57BL/6 foram inoculados com 1,0 x10^4 células TC-1 e após dois dias iniciado o esquema de imunização de 4 doses de cada uma das formulações: PBS, E7, peptídeo E7 (pepE7), peptídeo P10 (P10), rFliC ou combinações destas administradas a intervalos de uma semana pela via intranasal. Um grupo adicional foi imunizado com PBS e não recebeu células TC-1(ND). Após 40 dias do desafio os animais foram submetidos à eutanásia e os pulmões removidos para análise.

4.1.2.1.7 Avaliação da expressão de receptores do tipo Toll e do tipo NOD em células tumorais TC-1

Embora TLRs sejam expressos e ativos principalmente em células do sistema imune inato e adaptativo, tais como macrófagos e DCs, eles também podem ser funcionais em outros tipos celulares, por exemplo, células tumorais (SCHWARTZ; HERNANDEZ; MARK, 1999; YU; CHEN, 2008). Para investigar a expressão de TLR5 em células TC-1 foi realizado RT-PCR utilizando iniciadores específicos descritos na Tabela 1 da seção de M&M. Os resultados (Figura 25A e 25B) mostram que células TC-1 expressam os receptores TLRs 2-8, e também o receptor intracelular para flagelina Naip5, mas não expressam os receptores TLR1 e TLR9.

Além disso, para investigar a funcionalidade do TLR5, células TC-1 foram incubadas *in vitro* com rFliC (0,1 a 10 µg/mL), LPS (1 µg/mL) e CpG DNA (10 µg/mL) por 6 e 24 horas, e o sobrenadante analisado para a presença da citocina IL-6. Verificamos que células TC-1 produzem elevados níveis de IL-6, não sendo detectado aumento da produção desta citocina no sobrenadante de células estimuladas com LPS, rFliC ou CpG DNA (Figura 25C). Além disso, o sobrenadante foi investigado para a presença das citocinas IL-4, IL-10, IFN-□, TGF-β e TNF-α, mas nenhuma foi detectada. A ausência de incremento da produção de IL-6 no sobrenadante de células estimuladas com os agonistas de Toll (LPS e rFliC) sugere que os receptores TLR4 e TLR5 não são funcionais nestas células e ainda que células TC-1, por si, não apresentam capacidade para secretar fatores inibidores da resposta imunológica por efeito direto da ligação de flagelina ao TLR5 em sua superfície.

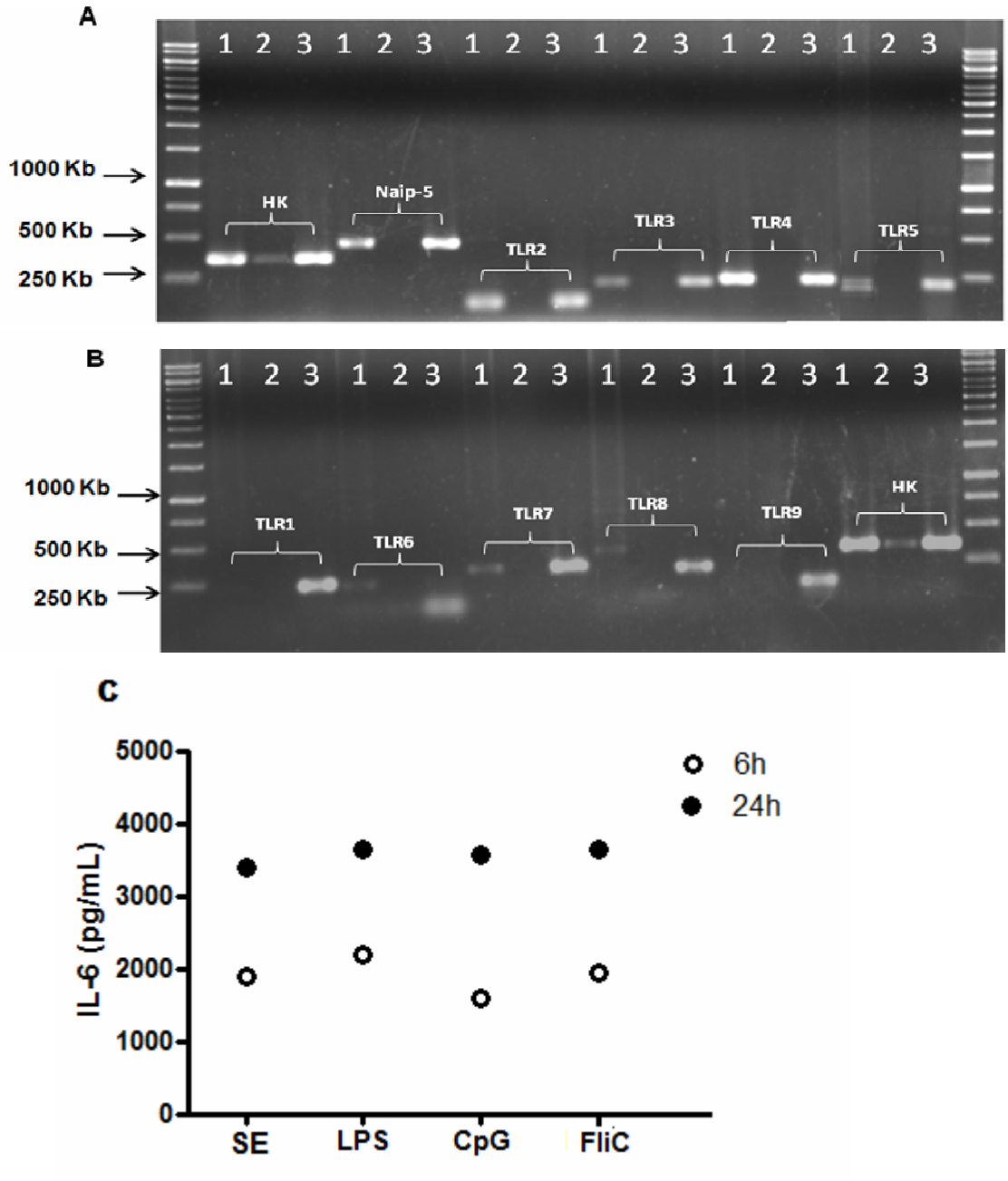


Figura 25 - Expressão e funcionalidade de PRRs em células tumorais TC-1. Para expressão de PRRs, RNA total de células TC-1 ou células do baço de camundongo C57BL/6 foram extraídos e utilizados para síntese de cDNA (A e B). Em seguida, PCR foi realizado utilizando iniciadores específicos para os receptores Toll 1-9 e Naip5. (1) Reação com material extraído de células TC-1 na presença ou (2) ausência de transcriptase reversa (TR), e (3) reação com material extraído de células do baço de camundongos C57BL/6 na presença de TR. Para controle da reação foram utilizados iniciadores para o gene da HK (controle "*Housekeeping*", HPRT). A determinação da funcionalidade do TLR5 foi realizada pela estimulação *in vitro* de células TC-1 na ausência (SE) ou presença dos ligantes de TLRs LPS (0,1 µg/mL), CpG (10 µg/mL) e rFliC (10 µg/mL) por 6 h ou 24 h (C). Após este período, o sobrenadante foi coletado para determinação da produção de IL-6. Valores referentes a um experimento realizado em duplicata.

4.1.2.1.8 Avaliação do efeito anti-tumoral terapêutico em camundongos TLR5$^{-/-}$ imunizados com formulações que empregaram rFliC como adjuvante para a proteína E7 do HPV-16

Animais TLR5$^{-/-}$ foram desafiados via s.c. com 7,5 x10^{4} células TC-1 e em seguida imunizados com três doses de PBS ou rFliC, administradas semanalmente pela via subcutânea. Cerca de 60% dos animais TLR5$^{-/-}$ imunizados com PBS ou rFliC permaneceram livres de tumor por até 45 dias após o desafio com TC-1, enquanto todos os animais C57BL/6 apresentaram tumor em até três semanas do desafio (Figura 26A, símbolos em cinza). Esses resultados mostram que a inoculação de flagelina não aumentou o desenvolvimento do tumor em animais que não expressam TLR5, sugerindo a participação de células do sistema imunológico para o efeito de promoção do tumor visualizado anteriormente. Curiosamente, quando os animais livres de tumor foram re-desafiados com 10X mais células TC-1 que aquela inoculada no desafio inicial, apenas os animais inoculados com flagelina permaneceram protegidos (Figura 26A), sugerindo que o efeito adjuvante da flagelina foi independente de TLR5, e possivelmente dependente da ligação de receptores intracelulares, tais como Ipaf/Naip5 ou ainda de outras vias de sinalização para flagelina, mas que até o momento são desconhecidas. Como esperado, animais TLR5$^{-/-}$ que foram desafiados com células TC-1 e inoculados com flagelina via s.c. apresentaram baixa produção de IL-6 no soro, sugerindo uma possível participação desta citocina para o desenvolvimento do tumor.

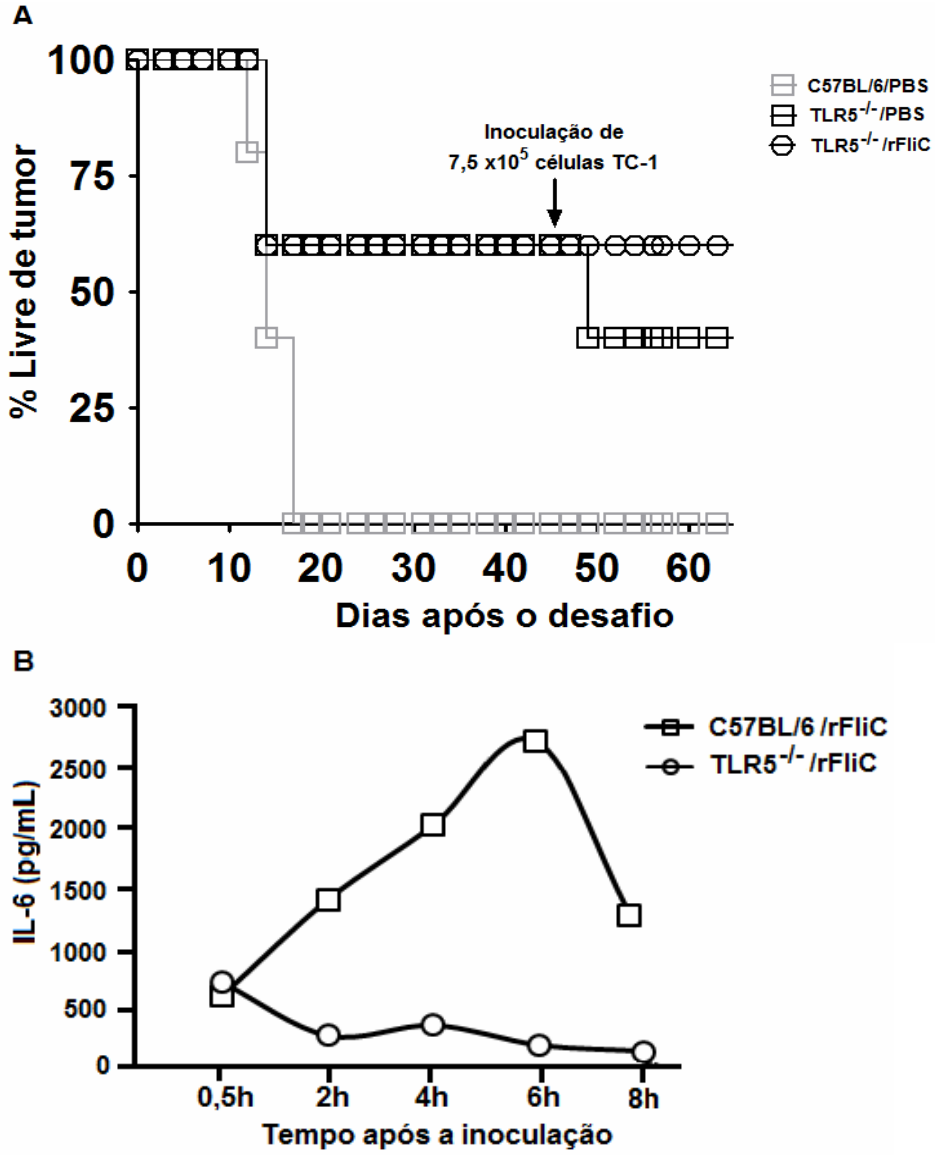


Figura 26 - Avaliação do efeito anti-tumoral terapêutico em camundongos TLR5$^{-/-}$ desafiados com células TC-1 pela via s.c. e tratados com flagelina. (A) Camundongos C57BL/6 TLR5$^{-/-}$ foram inoculados com 7,5 x10^{4} células TC-1 e após dois dias iniciado o esquema de imunização de 3 doses de PBS ou flagelina, administradas a intervalos de uma semana pela via s.c. Um grupo de 5 animais C57BL/6 (PBS em cinza) foi desafiado com células TC-1 e utilizado como controle. Após 50 dias do desafio, os animais que não desenvolveram tumor foram novamente desafiados com 7,5 x10^{5} células TC-1 pela mesma via e acompanhados para o desenvolvimento do tumor. (B) Camundongos C57BL/6 selvagens ou TLR5$^{-/-}$ foram inoculados com 5 µg flagelina via s.c. dois dias após o desafio tumoral e a quantidade de citocina IL-6 dosada no soro no período de 0,5 h a 6 h após a inoculação.

4.1.2.1.9 Avaliação do efeito anti-tumoral terapêutico de formulações vacinais que empregam rFliC como adjuvante para uma vacina de DNA anti-tumor induzido por HPV-16

Vacinas de DNA são conhecidas por promover forte ativação de resposta imunológica celular em diferentes modelos, inclusive em formulações anti-tumor induzido por células TC-1 (LASARO et al., 2005; DINIZ et al., 2010). Nesta parte do trabalho exploramos a capacidade da flagelina rFliC de *Salmonella* atuar como adjuvante para uma formulação vacinal onde o antígeno E7 está codificado em DNA plasmidiano (pE7). Além disso, o efeito adjuvante da flagelina foi avaliado para outra formulação vacinal desenvolvida pelo nosso grupo e que codifica o adjuvante gD, uma glicoproteína do Herpes vírus, fusionada à proteína E7 (pgDE7) do HPV-16 (DINIZ et al., 2010), na tentativa de aumentar a proteção inicial de 40% promovida pela administração s.c. de uma única dose de 100 µg desta vacina. Grupos de cinco camundongos C57BL/6 foram desafiados via s.c. com $7,5x10^4$ células TC-1 (no dia 0). Cada grupo recebeu uma única dose de 100 µg de DNA codificando E7 (pE7) ou gDE7 (pgDE7) inoculado via i.m. na coxa do animal. Todos os grupos receberam o DNA no segundo dia após o desafio (dia 2), no entanto, três grupos foram imunizados com a mesma formulação (pE7 ou pgDE7), modificando-se apenas o dia em que receberam o adjuvante flagelina: um grupo recebeu o adjuvante no primeiro dia após o desafio, ou seja, 24 h antes de receber o antígeno (rFliC+pE7 ou rFliC+pgDE7); outro grupo recebeu o adjuvante no mesmo dia que recebeu o DNA, ou seja, junto com o antígeno (pE7/rFliC ou pgDE7/rFliC); e o terceiro grupo recebeu o adjuvante no terceiro dia após o desafio, ou seja 24 h após receber o antígeno (pE7+rFliC ou pgDE7+rFliC). O adjuvante rFliC (5 µg) foi inoculado via s.c. em local próximo ao da injeção de DNA uma vez que no tecido muscular a quantidade de APCs é reduzida. O desenvolvimento do tumor foi acompanhado nesses animais até que atingisse 1,5 cm de tamanho.

Os resultados apresentados na figura 27A revelam que a administração de pE7 ou rFliC não promoveu qualquer nível de proteção anti-tumoral e todos os animais desenvolveram tumor de modo similar aqueles imunizados com PBS, enquanto a administração do plasmídeo pgDE7 promoveu a proteção esperada de cerca de 40%. Além disso, a administração de flagelina com pE7 não promoveu qualquer retardo no desenvolvimento do tumor, em qualquer tempo em que foi

inoculada (Figura 27B). Verificamos ainda que nos animais em que a inoculação de flagelina foi anterior ou junto com a vacina de DNA, o tumor apareceu precocemente em relação ao grupo onde flagelina foi administrada após a inoculação do DNA (Figura 27B). Resultado similar foi encontrado com a administração de flagelina a animais imunizados com pgDE7, onde verificamos que rFliC administrada após a inoculação de DNA (pgDE7+rFliC) retardou o aparecimento do tumor (Figura 27C) e promoveu aumento da proteção mediada pela vacina pgDE7 em cerca de 20%, enquanto a inoculação de flagelina antes do DNA (rFliC+pgDE7) não alterou a proteção inicialmente encontrada. Por outro lado, nos animais que receberam flagelina junto com pgDE7 (pgDE7/rFliC) o crescimento do tumor foi acelerado, e os tumores desenvolveram-se em tempo inferior aquele que geralmente ocorre após a inoculação desta quantidade de células TC-1 em animais tratados com PBS.

Informações adicionais são fornecidas na tabela 2, onde podemos verificar o tempo de surgimento do tumor e sua cinética de crescimento. Nos grupos controles imunizados com PBS, pE7 ou rFliC o tumor apareceu após a segunda semana e cresceu rapidamente de modo que no 35^0 dia os animais foram submetidos a eutanásia devido o tamanho do tumor. O mesmo comportamento foi demonstrado nos grupos que receberam o plasmídeo pE7 e flagelina em qualquer tempo. Por outro lado, nos grupos que receberam pgDE7 com ou sem flagelina o tumor cresceu lentamente e apenas um animal foi sacrificado no 35^0 dia, chegando ao final do experimento sem que o tumor alcançasse o tamanho de 1,5 cm. Estas observações sugerem que a resposta imunológica gerada pelas formulações pgDE7+flagelina restringiu o desenvolvimento do tumor, e que a ordem em que a flagelina foi inoculada parece exercer um efeito muito discreto na proteção, embora os mecanismos responsáveis por este efeito não tenham sido investigados.

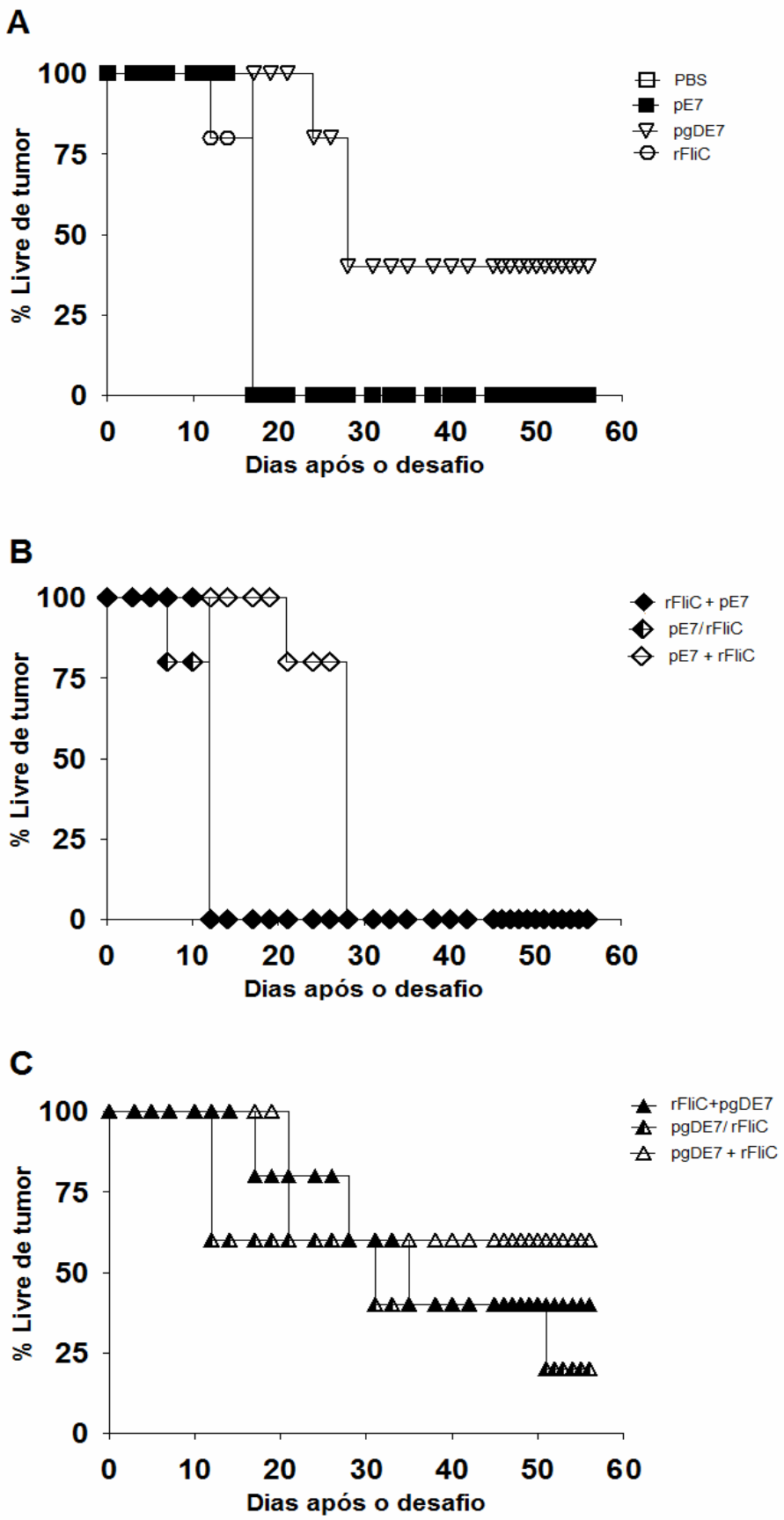
Tabela 2 - Avaliação do desenvolvimento do tumor

	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias	42 dias	56 dias
PBS	0/5	0/5	5/5	5/5	+++++	-	-
pE7	0/5	0/5	5/5	5/5	+++++	-	-
pgDE7	0/5	0/5	1/5	3/5	3/5, +	2/4, ++	0/2
rFliC	0/5	1/5	5/5	5/5	+++++	-	-
pE7 + rFliC	0/5	0/5	4/5	5/5	+++++	-	-
rFliC + pE7	0/5	0/5	5/5	5/5	+++++	-	-
pE7 c/ rFliC	0/5	1/5	5/5	5/5	+++++	-	-
pgDE7 + rFliC	0/5	0/5	2/5	2/5	2/5,+	1/4	1/4
rFliC + pgDE7	0/5	0/5	1/5	2/5	3/5, +	2/4	2/4
pgDE7 c/ rFliC	0/5	0/5	2/5	2/5	3/5, +	2/4	3/4

56 dias após o desafio os animais remanescentes foram sacrificados.

+: animal sacrificado pois o tumor estava >1,5 cm.

Figura 27 – Avaliação do efeito anti-tumoral terapêutico em camundongos desafiados com células TC-1 via s.c. e imunizados com 1 dose dos plasmídeos pE7 ou pgDE7 e flagelina purificada como adjuvante. Camundongos C57BL/6 foram inoculados via s.c. com 7,5 x10^4 células TC-1 e após dois dias, imunizados via i.m. com uma única dose de DNA codificando a proteína E7 (pE7) ou a proteína de fusão gDE7 (pgDE7). Além disso, os animais receberam uma única dose de flagelina (rFliC) administrada via s.c. nos dias 1, 2 ou 3. (A) Grupos imunizados com PBS, pE7, pgDE7 ou rFliC recombinante foram usados como controle; (B) Grupos imunizados com flagelina antes da injeção de DNA (rFliC+pE7), pE7 no mesmo dia da flagelina (pE7/rFliC) ou flagelina após a injeção de DNA (pE7+rFliC); e (C) grupos de animais imunizados com rFliC+pgDE7; pgDE7/rFliC ou pgDE7+rFliC. O desenvolvimento do tumor foi acompanhado por 56 dias ou até que atingisse 1,5 cm de tamanho, circunstância na qual os animais foram submeridos à eutanásia.


A
100
75
50
25
0
% Livre de tumor
0
10
20
30
40
50
60
Dias após o desafio
PBS
pE7
pgDE7
rFliC
B
100
75
50
25
0
% Livre de tumor
0
10
20
30
40
50
60
Dias após o desafio
rFliC + pE7
pE7/ rFliC
pE7 + rFliC
C
100
75
50
25
0
% Livre de tumor
0
10
20
30
40
50
60
Dias após o desafio
rFliC+pgDE7
pgDE7/ rFliC
pgDE7 + rFliC

4.1.2.1.10 Avaliação do efeito anti-tumoral terapêutico de uma vacina de DNA que codifica a flagelina de *Salmonella* em fusão ao antígeno E7 do HPV-16

O efeito adjuvante da flagelina de *Salmonella* foi avaliado na forma de vacina de DNA. A sequência genética que codifica para os 60 primeiros aminoácidos da proteína E7 do HPV-16 foi sintetizada em fusão substituindo a região central hipervariável da flagelina FliC de *Salmonella* após otimização de códons para expressão em humanos. O gene sintético foi inserido em vetor para expressão em eucarioto e denominado pFliC ou pFliC-E7. Além disso, a vacina foi construída de modo que a proteína de fusão FliC-E7 produzida permanecesse no citoplasma da célula transfectada. Os plasmídeos codificando a proteína de fusão FliC-E7 ou FliC foram avaliados para a capacidade de conferir proteção terapêutica contra tumores induzidos por células TC-1 após a inoculação em camundongos C57BL/6. Grupos de cinco animais foram desafiados com $7,5x10^4$ células TC-1 pela via s.c. e, subsequentemente, imunizados com 3 doses de PBS, pFliC (100 µg) ou pFliC-E7 (100 µg) administradas a intervalos de uma semana pela via intramuscular. O protocolo de imunização foi iniciado dois dias após o desafio e os animais observados quanto ao desenvolvimento de tumor subcutâneo durante 50 dias ou até que o tumor atingisse o diâmetro de 1,5 cm. Observamos o surgimento de tumor palpável cerca de 14 dias após o desafio, em dois animais imunizados com pFliC-E7, mas o tumor rapidamente regrediu e 100% dos animais permaneceram protegidos até 60 dias após o desafio. Destaca-se que 40% dos animais que receberam o plasmídeo pFliC, codificando apenas a flagelina, foram protegidos ao final dos 60 dias (Figura 28). No sexagésimo dia após o desafio, os animais remanescentes livres de tumor foram inoculados com uma quantidade de células TC-1 10X superior àquela inoculada no desafio inicial (indicado pela seta preta na Figura 28). Nesse mesmo dia, um grupo de camundongos virgens foi desafiado e como podemos observar (símbolos em cinza) o surgimento do tumor ocorreu em intervalo de tempo inferior aquele geralmente encontrado quando $7,5x10^4$ células TC-1 são inoculadas. 100% dos animais imunizados com pFliC-E7 e 40% dos animais imunizados com pFliC permaneceram livres de tumor até vinte dias do segundo desafio, mas, ao final de 40 dias do segundo desafio, apenas os animais imunizados com pFliC-E7 permaneceram protegidos, totalizando uma proteção de 60% (Figura 28). Estes dados mostram que a administração de flagelina na forma de

DNA, mas não de proteína purificada, promoveu proteção terapêutica de 60-100% dos animais com a administração de apenas 3 doses.

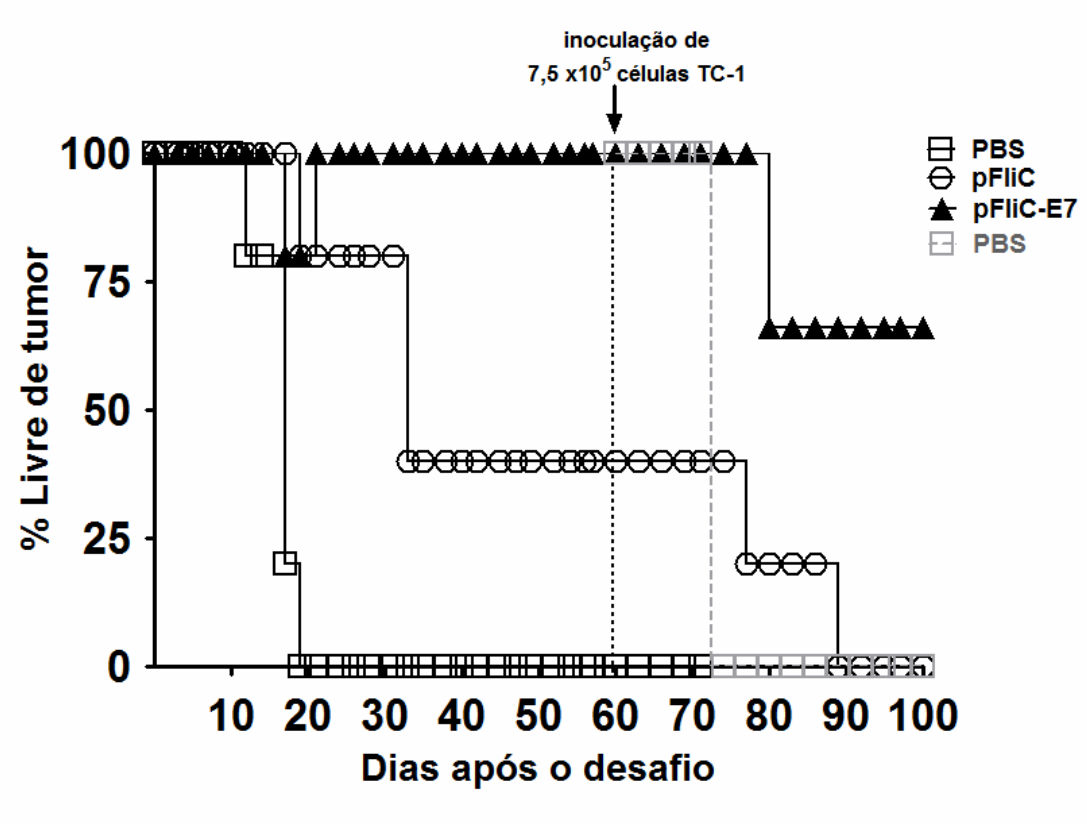


Figura 28 - Avaliação do efeito anti-tumoral terapêutico de formulações vacinais de DNA codificando o antígeno E7 em fusão à flagelina de *S.* Typhimurium. Camundongos C57BL/6 foram inoculados via s.c. com 7,5 x10^4 células TC-1 e após dois dias iniciado o esquema de imunização de 3 doses de cada uma das formulaçõe: PBS, pFliC ou pFliC-E7 administradas a intervalos de uma semana pela via intamuscular. O desenvolvimento do tumor foi acompanhado por 56 dias ou até que atingisse 1,5 cm de tamanho, circunstância na qual os animais foram submetidos à eutanásia. No sexagésimo dia após o desafio, os animais que não desenvolveram tumor foram novamente desafiados com 7,5 x10^5 células TC-1 via s.c. e acompanhados para o desenvolvimento do tumor por mais 40 dias. No dia do segundo desafio um grupo adicional foi também desafiado (PBS em cinza) e utilizado como controle.

4.1.2.2 Discussão dos Resultados

A descoberta dos TLRs e seus ligantes representa uma fonte de novos adjuvantes para o desenvolvimento de vacinas, e muitos de seus agonistas foram testados em diferentes modelos de infecção viral e bacteriana. Recentemente, alguns ligantes de TLRs foram também testados no tratamento de câncer, por exemplo, o imiquimode (agonista do TLR7) avaliado no tratamento de carcinoma basal superficial (STOCKFLETH et al., 2003); CpG (agonista do TLR9) avaliado em pacientes com melanoma e linfoma (JAHRSDORFER; MUHLENHOFF, 2005; SPEISER et al., 2005); e o MPL (agonista do TLR4) avaliado no tratamento de câncer induzido por HBV e outros patógenos (BALDRIDGE et al., 2004).

Vários mecanismos foram propostos para o aparente efeito adjuvante de agonistas de toll na imunidade anti-tumor. (i) O reconhecimento do ligante de toll pelo TLR cognato estimula a secreção de citocinas pró-inflamatórias e aumenta a expressão de moléculas co-estimuladoras em células dendríticas que são importantes para a diferenciação de células T em células efetoras e indução de potente imunidade adaptativa; (ii) alguns ligantes de TLRs podem estimular diretamente a proliferação e diferenciação de células T $CD4^+$ em subpopulações Th1, Th2 e Th17; (iii) alguns ligantes de Toll agem revertendo a função supressora de células T reguladoras (CRELLIN et al., 2005; TABIASCO et al., 2006); e (iv) alguns agonistas de Toll, como o TLR3 e TLR9, podem induzir apoptose de células tumorais que expressam TLRs (JAHRSDORFER et al., 2005; SALAUN et al., 2006).

Flagelinas, especialmente aquelas produzidas por linhagens de Salmonelas, estão entre os agonistas de Toll mais frequentemente utilizados em formulações vacinais devido suas propriedades imunoestimuladoras intrínsecas. Apesar da abundância de dados sobre os efeitos adjuvantes da flagelina, principalmente para ativação de resposta humoral, muitas questões sobre os mecanismos que norteiam sua adjuvanticidade e a natureza contraditória das respostas imunológicas celulares induzidas por esse agonista permanecem abertas, sendo o principal motivo pelo qual sua utilização para ativação de respostas citotóxicas ainda é incipiente. Nesta parte do trabalho, investigamos o potencial adjuvante de flagelinas derivadas de *Salmonellas* para ativação de células T $CD8^+$ específicas para o antígeno E7 do HPV-16 no modelo de proteção terapêutica contra o desenvolvimento de tumores

TC-1, onde a atividade efetora de células T $CD8^+$ é a principal responsável pela erradicação de células tumorais.

Nossos resultados mostram que a flagelina promoveu apenas discreta proteção terapêutica quando co-administrada ao antígeno E7 pela via intranasal em animais que foram desafiados com células TC-1 por via i.v., e, portanto, que desenvolveram os nódulos tumorais no pulmão. Curiosamente, quando flagelina foi administrada na ausência de antígeno exógeno, o efeito visualizado foi oposto, ocorrendo aumento do número e do tamanho dos nódulos tumorais, de maneira dose dependente. Estes resultados mostram que a administração de flagelina na ausência de um componente específico do tumor não exerceu qualquer efeito protetor, sugerindo que a proteção visualizada foi mediada por células da imunidade adaptativa. No entanto, não detectamos a presença de células T $CD4^+$ ou T $CD8^+$ E7-específicas produtoras de IFN-ɣ em animais imunizados com até 4 doses da formulação E7+rFliC, antes do desafio com células TC-1, possivelmente devido ao baixo número desta população celular no momento em que o ensaio foi realizado. Por outro lado, a administração de flagelina antes do desafio com células TC-1, no esquema profilático-terapêutico, promoveu o desenvolvimento dos tumores em todos os grupos, principalmente no grupo imunizado apenas com flagelina. Esta observação sugere um componente temporal para o efeito da flagelina, onde sua inoculação precoce promove o crescimento do tumor e a inoculação tardia restringe.

O contrastante efeito da flagelina no crescimento do tumor pode ser reflexo de mudanças no padrão da resposta imunológica induzida Th1/Th2, da ativação de células T reguladoras ou ainda de um efeito direto sobre as células tumorais. De fato, alguns trabalhos mostram que a flagelina promove um padrão de citocinas do tipo Th2 dominante (MCSORLEY et al., 2002; CUNNINGHAM et al., 2004; DIDIERLAURENT et al., 2004; BRAGA et al., 2009). A análise do perfil de citocinas no pulmão de animais desafiados via i.v. com células TC-1, e que não receberam qualquer tratamento, revelou um padrão misto Th1>Th2, com maior produção das citocinas IFN-ɣ e TNF-α (Figura 19A e 19D) neste grupo do que naqueles grupos onde a flagelina estava presente na formulação vacinal. Além disso, animais desafiados e imunizados com o antígeno E7 apresentaram resposta Th1 dominante e isto explica porque a administração terapêutica de E7 sem adjuvante promoveu pequena proteção nos animais. A administração de flagelina logo após a implantação das células tumorais desvia o padrão mixto (Th1<Th2), naturalmente

induzido pelo tumor, para um padrão Th2 dominante (Th2>Th1), com maior produção das citocinas IL-4 e IL-10, deslocando o equilíbrio estabelecido entre o tumor e a resposta imunológica do hospedeiro. Por outro lado, quando flagelina foi administrada junto com o antígeno E7, após a implantação das células TC-1, ela pôde manter ou expandir a resposta Th1 dominante pré-induzida pelas células TC-1, inclusive com auxílio da resposta induzida pelo antígeno E7, aumentando a proteção. A resposta Th2 induzida pela flagelina pode ainda ser responsável pelo efeito de exacerbação do crescimento do tumor em animais que foram inoculados precocemente com flagelina no esquema de imunização profilático-terapêutico e corrobora a hipótese do componente temporal para o efeito evidenciado. A dosagem de citocinas no pulmão de animais que foram imunizados i.n. no esquema de 4 doses semanais, mas que não foram desafiados com células TC-1 mostra claramente que a administração de flagelina, na ausência de antígeno, induziu um padrão de citocinas Th2 dominante (Figura 20D), enquanto a administração de E7 ou E7+rFliC induziu um padrão Th1 dominante, com alta produção de IFN-γ e TNF-α (Figura 20A e 20C). Logo, acreditamos que a administração de flagelina antes da implantação de células TC-1 favoreceu a produção de citocinas do tipo Th2 e criou um microambiente que favoreceu o desenvolvimento do tumor uma vez que a resposta natural do hospedeiro que controlaria o crescimento do tumor foi desviada. Efeito similar foi demonstrado em modelo de câncer de mama murino, onde a inoculação profilática de flagelina promoveu aumento da taxa de crescimento do tumor, mas a inoculação tardia promoveu retardo do crescimento tumoral (SFONDRINI et al., 2006).

Recentemente o grupo do Dr. Dekai Zhang observou em modelo animal desafiado com diferentes linhagens de tumor mamário adaptado, que a administração de flagelina i.v. ou s.c. retardou o crescimento do tumor (CAI et al., 2011). No entanto, o esquema de imunização terapêutica utilizado nos modelos tumorais descritos anteriormente (SFONDRINI et al., 2006; CAI et al., 2011), onde a administração de flagelina induziu pronunciado efeito anti-tumor, consistiu da inoculação de flagelina no momento em que o tumor era palpável, geralmente após 10 dias do desafio, enquanto o esquema de imunização profilática, no qual não houve proteção mais sim aumento do tamanho do tumor, consistiu na inoculação de flagelina junto com as células tumorais ou até 1-2 dias após o desafio, ou seja, o intervalo de tempo utilizado em nosso estudo e considerado como esquema

terapêutico. No entanto, a escolha do esquema de imunização utilizado no presente trabalho, no qual a administração de flagelina foi realizada após 2 dias do desafio, foi baseada na agressividade do tumor TC-1 e na experiência do grupo, onde a proteção completa anti-tumor mediada por formulações baseadas em vacinas de DNA decrescia com o espaçamento do tempo entre o desafio e a imunização (DINIZ, 2010).

Em adição ao componente temporal influenciando na modulação da resposta imunológica induzida pela flagelina, esta pode ter contribuído diretamente para a ativação ou expansão de células T reguladoras (Treg) na vizinhança do tumor. A expressão de diferentes TLRs em células Treg foi recentemente documentada, mas o efeito resultante desta ativação permanece inconclusivo uma vez que efeitos distintos foram detectados (PENG et al., 2005; SUTMULLER et al., 2006). De fato, dados obtidos pelo grupo do Dr. Levings demonstraram que a ligação de flagelina ao TLR5 na superfície de células Treg humanas aumentou a atividade supressora destas (CRELLIN et al., 2005) ao invés de revertê-la como demonstrado para o ligante de TLR8 (PENG et al., 2005). No entanto, tentativas para determinar o percentual de Tregs no sangue ou baço de animais desafiados com células TC-1 e tratados com a formulação E7+rFliC não tiveram sucesso, provavelmente devido problemas com a metodologia.

No início da descoberta dos TLRs acreditava-se que esses seriam expressos somente em células do sistema imunológico tais como DC, macrófagos, monócitos e linfócitos. Mais tarde, sua presença foi verificada em células epiteliais de praticamente todos os tecidos, e hoje, existem fortes evidências da expressão de TLRs em muitos tipos de tumores, embora a importância biológica da ativação desses receptores nessas células permaneça desconhecida (PENG et al., 2005; FU et al., 2006; HUANG et al., 2008; YU; CHEN, 2008). Estudos recentes sugerem que a ativação de TLRs pode desempenhar importante papel na progressão e desenvolvimento de câncer, entretanto, a ativação de diferentes TLRs pode apresentar resultados completamente distintos (CHANG et al., 2005; KANZLER et al., 2007; RYDBERG et al., 2009; SHIROTA; KLINMAN, 2011). Por exemplo, o grupo do Dr. Dekai Zhang verificou a presença e funcionalidade de TLR5 em tumor mamário humano e demonstrou que a administração de flagelina inibiu a proliferação e crescimento deste *in vitro* e *in vivo* em camundongos transplantados com células de tumor de mama humano, respectivamente (CAI et al., 2011). Além disso, ensaios

in vitro demonstraram que a ativação de TLR5 em células de tumor de colón humano por flagelina induziu necrose tumoral e inibiu o crescimento e metástase do tumor *in vivo,* em camundongos transplantados com carcinoma de colón humano (RHEE; POTHOULAKIS, 2008). Ao investigarmos a expressão de TLRs em células TC-1 encontramos que estas expressam os receptores TLR2 a TLR8, além do receptor intracelular da flagelina Naip5, sugerindo um papel para a ativação desses receptores nas células TC-1. No entanto, tentativas de verificar a funcionalidade do TLR5 por meio da produção de IL-6 sugerem que os receptores TLR5, e TLR4, destas células não estão funcionais e que a flagelina não atuou diretamente sobre as células tumorais.

Por outro lado, a observação de que células TC-1 naturalmente produzem IL-6 sugere que esta citocina pode exercer importante papel na fase inicial de implantação do tumor. De fato, IL-6 pode atuar tanto como citocina pró-inflamatória quanto anti-inflamatória, sendo que sua ação pró-inflamatória se dá por meio do recrutamento e/ou ativação de diferentes tipos celulares, enquanto sua ação anti-inflamatória ocorre por meio de seu efeito inibidor de TNF-α e IL-1. Além disso, outros autores relataram que IL-6 exerce efeito inibidor sobre a proliferação de vários tipos de tumores (SHEN et al., 2002), mas em outros cenários esta citocina foi relacionada à proliferação celular e crescimento de tumores (SASSER et al., 2007; CULIG, 2011). Somando-se essas observações ao fato de que flagelina induz elevada e transiente produção de IL-6 imediatamente após inoculação *in vivo* (Figura 9B), IL-6 pode ter um papel relevante para a implantação e/ou desenvolvimento do tumor.

Além disso, quando animais TLR5$^{-/-}$ foram inoculados via s.c. com células TC-1 e submetidos ao esquema de imunização com PBS ou rFliC (Figura 26A), verificamos proteção de 40% e 60% dos animais, respectivamente; acompanhada de significante redução da produção de IL-6 (Figura 26B), confirmando que a inoculação de flagelina em camundongos selvagens exerce efeito pró-tumoral, e além disso, esse efeito não é mediado diretamente sobre as células tumorais, mas provavelmente, por meio de sua interação com TLR5 de outros tipos celulares presentes no ambiente tumoral ou por meio da liberação de fatores solúveis. Esses resultados revelam a complexidade biológica e funcional da utilização de agonistas de TLRs no tratamento de câncer.

Nossos resultados sugerem que a polarização Th2 prevalece quando flagelina é introduzida durante a fase de sensibilização do sistema imunológico, sendo este mecanismo o principal responsável pela progressão do tumor. Na tentativa de contrapor o efeito da polarização Th2 mediado pela flagelina, agregamos o peptídeo P10 às formulações avaliadas por acreditarmos que este peptídeo apresenta potencial imunomodulador da resposta imunológia quando em associação a flagelina (BRAGA et al., 2009). A dosagem de citocinas no pulmão de camundongos C57BL/6 imunizados com P10, rFliC ou a combinação P10+rFliC mostra claramente que a inoculação de P10 junto com flagelina exerceu efeito sinérgico sobre a produção de IFN-γ e, consequentemente, desviou a resposta imunológica para o padrão Th1 dominante (Figura 23C). O mesmo resultado foi observado para a produção de TNF-α (resultado não apresentado). Como esperávamos, a administração do peptídeo P10 com a formulação E7+rFliC promoveu aumento da proteção inicialmente vista para a formulação, mas o efeito resultante foi muito discreto, não ocorrendo proteção total. Curiosamente, verificamos pronunciado efeito protetor quando P10 foi administrado junto com E7 na ausência de flagelina, sugerindo mais uma vez o papel da flagelina na promoção do padrão da resposta Th2, já que a reposta induzida em animais desafiados com TC-1 e imunizados com E7 foi Th1 dominante e, provavelmente, o somatório dos efeitos do P10 e E7 foram responsáveis pelo aumento da proteção. Em adição, dados apresentados por Shirota et al. (2011) mostram claramente que formulações vacinais que empregaram CpG DNA como adjuvante, administrado nas formas livre ou conjugado a células TC-1 apoptóticas, promoveram redução do crescimento de tumores TC-1 após administração profilática a camundongos. Vale destacar que não detectamos a presença de TLR9 em células TC-1, e, somando-se a esta observação, a natureza da resposta imunológica desencadeada por CpG (Th1 dominante), corroboram a hipótese de que o padrão Th2 induzido pela flagelina contrapõe a resposta imunológica Th1 que protegeria os animais. Além disso, corroboram a hipótese da utilização de P10 para modular a resposta da flagelina para o padrão Th1 dominante (ROMAN et al., 1997; DITTMER; OLBRICH, 2003).

As formulações utilizadas neste trabalho foram capazes de promover apenas discreta proteção terapêutica ao desenvolvimento de tumores TC-1, provavelmente devido à fraca ativação de linfócitos T $CD8^+$ tumor-específico. No entanto, a baixa geração de CTLs é um efeito esperado para o tipo de formulação utilizada, uma vez

que antígenos exógenos não são eficientemente apresentados via MHC-I; um dos pré-requisitos para a ativação de linfócitos T $CD8^+$ virgens. Antígenos exógenos são normalmente endocitados por APCs e apresentados via MHC-II para linfócitos T $CD4^+$, enquanto antígenos próprios ou virais, produzidos no citoplasma da célula, são apresentados via MHC-I para linfócitos T $CD8^+$. Obviamente, a restrição da apresentação de antígenos via MHC traz inúmeras vantagens para o sistema, mas em ocasiões especiais existe a necessidade de que um antígeno exógeno seja apresentado via MHC-I, mecanismo conhecido como apresentação cruzada (do inglês "*Cross-presentation"*). No entanto, esse mecanismo requer a participação de uma APC profissional, como a DC, mas DCs dos tecidos periféricos não são especializadas na apresentação cruzada e necessitam transportar o antígeno para órgãos linfóides secundários e transferí-lo para DCs $CD8\alpha^+$ residentes, especialistas no "*Cross-priming"* (sensibilização cruzada) (KURTS; ROBINSON; KNOLLE, 2010). A necessidade de cooperação entre diferentes subtipos de DCs, além da necessidade de fatores ativadores, faz do *cross-priming* um fenômeno raro e resulta na baixa eficiência das vacinas de subunidades para ativação de linfócitos T $CD8^+$. Para atestar esta hipótese, flagelina foi co-administrada com o plasmídeo que codifica o antígeno E7 (pE7). A produção de E7 intracelular poderia facilitar seu processamento e apresentação via MHC-I e junto com o estímulo externo da flagelina, via TLR5, forneceria o segundo sinal necessário para maturação de DCs e, conseguintemente, eficiente sensibilização de linfócitos T $CD8^+$. No entanto, nenhum efeito protetor foi visualizado (Figura 27B), sugerindo que a baixa proteção mediada pela vacina não se deve apenas a deficiência de apresentação via MHC-I.

A influência da apresentação de antígeno sobre o potencial adjuvante da flagelina para ativação de CTLs foi ainda explorada com a utilização de vacinas de DNA que codificam flagelina em fusão à E7 (pFliC-E7). Os resultados obtidos (Figura 28) mostram que a administração de apenas três doses da formulação pFliC-E7 foi capaz de promover 100% de proteção terapêutica. Além disso, a administração de pFliC foi capaz de proteger 40% dos animais, sendo estes os melhores resultados obtidos com a utilização de flagelina como adjuvante para vacinas terapêuticas contra tumor TC-1. Quando expressas, as proteínas FliC ou FliC-E7 são retidas no citoplasma da célula, onde podem interagir com a maquinaria do proteassoma para processamento e apresentação via MHC-I. No ensaio anterior confirmamos que a presença do antígeno no citoplasma da célula não parece ser o principal

responsável pelo pronunciado incremento de proteção anti-tumoral, já que animais inoculados com pE7, que também produz o antígeno E7 no citoplasma da célula, não apresentaram qualquer proteção terapêutica visível. No entanto, é importante lembrar que o nível de expressão do antígeno E7 tem estreita correlação com a magnitude da resposta imunológica gerada com imunizações (CID-ARREGU; JUAREZ; HAUSEN, 2003) e neste caso, os genes dos plasmídeos pFliC ou pFliC-E7 tiveram seus códons otimizados para expressão em células eucariotas, enquanto aqueles dos plasmídeos pE7 ou pgDE7 não foram otimizados. Além disso, experiência prévia do grupo mostrou que a otimização de códons de pgDE7 promoveu aumento da resposta imunológica e da proteção terapêutica (DINIZ, 2010). Em suma, nem a entrega do antígeno no citoplasma da célula, nem o aumento da expressão de E7 poderiam explicar, isoladamente, o efeito de proteção terapêutica visualizado com a utilização da formulação pFliC-E7, sugerindo a ligação da flagelina a outros receptores celulares.

A detecção de flagelina por células do sistema inato é realizada por membros de duas famílias de receptores, os "*Toll-like receptors*", no caso o TLR5; e os "*Nod-like receptors*", dos quais IPAF e Naip5, especificamente. O receptor TLR5 é responsável pelo reconhecimento de flagelina extracelular (RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004), enquanto os receptores IPAF e Naip5 são responsáveis pelo reconhecimento de flagelina no espaço intracelular (LIGHTFIELD et al., 2008). Até o momento não há relatos na literatura que exploram o efeito da ativação dos receptores IPAF/Naip5 como mediadores das propriedades imunoestimuladoras da flagelina. No entanto, recentemente foi demonstrado que parte do efeito adjuvante do Alum é decorrente da ativação de NLRP3, sugerindo que os receptores IPAF/Naip5 podem mediar alguns dos efeitos adjuvantes da flagelina (DE GREGORIO; TRITTO; RAPPUOLI, 2008).

O reconhecimento da flagelina por receptores intracelulares leva à ativação de caspase-1 seguida por morte celular do tipo piropitose; um mecanismo diferente daquele mediado pela interação de flagelina/TLR5, onde ocorre ativação de NF-κB e liberação de citocinas pró-inflamatórias (MIAO et al., 2007). Além disso, a piropitose é um evento altamente inflamatório e pode ter contribuído de forma mais potente para ativação da resposta imunológica, e consequentemente, para a proteção dos animais imunizados com vacinas de DNA codificando flagelina. A ativação de IPAF também leva a produção de IL-1β e IL-18, duas potentes citocinas pró-inflamatórias.

IL-1β induz inflamação local enquanto a IL-18 age junto com IL-12 para promover a secreção de IFN-ɣ por linfócitos Th1 (LIGHTFIELD et al., 2008). Aparentemente a ativação de receptores intracelulares foi ainda responsável pelo efeito anti-tumoral terapêutico em animais $TLR5^{-/-}$ tratados com flagelina, no entanto investigações adicionais são necessárias.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ênfase histórica na resposta imunológica humoral como mecanismo requerido para proteção de doenças infecciosas tem levado ao desenvolvimento de vacinas com habilidade para aumentar a produção de anticorpos. Como conseqüência, muitos adjuvantes comumente utilizados são efetivos para elevar os títulos de anticorpos séricos, mas não promovem significante ativação de respostas celulares. A capacidade de um adjuvante para afetar qualitativamente o resultado da resposta imunológica adaptativa por modular o padrão de citocinas Th1/Th2 ou promover ativação de CTLs é um aspecto importante que deve ser considerado devido a necessidade de vacinas contra doenças infecciosas tais como, malária, Chagas, AIDS, hepatite C (HCV) e câncer, entre outras. Essas doenças são causadas por patógenos que apresentam grande variação antigênica, diferentes formas e reservatórios celulares, requerendo, muitas vezes o emprego de diferentes antígenos e estratégias vacinais para promover proteção. Essas necessidades têm modificado o foco do desenvolvimento de vacinas para a geração de ampla resposta imunológica humoral e celular, sendo a especificidade do adjuvante e o conhecimento de seus mecanismos de adjuvanticidade pontos determinantes para a efetividade das vacinas.

Nosso conhecimento sobre a imunobiologia das células reguladoras, células apresentadoras de antígenos, importância da resposta mediada por linfócitos T e a contribuição de alguns mecanismos imunológicos para a resolução de determinadas patologias fornece um referêncial contínuo para otimização de futuras vacinas. Nesse contexto, a adequada ativação de células T tornou-se um marco importante para o desenvolvimento de novas vacinas e muitos adjuvantes estão sendo testados em ensaios pré-clínicos e clínicos com esse objetivo. No entanto, o nível de complexidade requerido para ativação de células T, principalmente linfócitos T $CD8^+$, implica em muitos desafios, os quais iniciam com a escolha do antígeno, mas englobam desde a composição da formulação vacinal, forma de administração, esquema de imunização, população alvo e avaliação da resposta de CTL, dentre outros aspectos. A utilização de imunomoduladores capazes de promover ativação dessa população celular oferece a oportunidade para contornarr alguns destes problemas e obter sucesso.

Flagelinas bacterianas, especialmente aquelas produzidas por espécies de *S. enterica*, representam uma classe promissora de adjuvantes vacinais conforme demonstrado em inúmeros trabalhos descritos nestes quase 20 anos de estudos.

Flagelina também exibe inúmeras vantagens para uso em humanos, as quais recentemente foram confirmadas em cinco ensaios clínicos (www.clinicaltrials.gov). No entanto, a maioria dos trabalhos empregou flagelina de *Salmonella* em formulações vacinais destinadas à ativação de linfócitos B ou T $CD4^+$, de modo que o papel desse adjuvante para ativação de linfócitos T $CD8^+$ permanece obscuro, com apenas meia dúzia de trabalhos publicados nos últimos 8 anos que investigaram tal aspecto.

Este trabalho representa um compêndio de várias abordagens vacinais utilizadas para avaliar o potencial adjuvante de flagelinas de *Salmonella* no contexto da ativação de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ realizadas pela pesquisadora em 7 anos de estudo. As abordagens utilizadas para avaliação do potencial adjuvante da flagelina consistiram no emprego de vacinas de primeira geração- baseadas na utilização de linhagens vacinais de *Salmonella* que expressam flagelos quiméricos produzidos a partir da fusão do antígeno à flagelina; vacinas de subunidades- onde a flagelina foi utilizada na forma de proteína de fusão ou co-administrada com antígenos protéicos ou peptídicos; e por fim, vacinas de terceira geração- onde a informação genética codificando para flagelina e/ou antígeno foram entregues na forma de DNA plasmidiano. Além disso, foram utilizados antígenos de origem fúngica, parasitária, viral e tumoral que foram administrados por vias de mucosa e parenteral, sendo, portanto, uma referência dos vários aspectos da complexa reposta imunológica desencadeada por esse adjuvante.

Nossa experiência com o uso de flagelinas de *Salmonella* como adjuvante vacinal nos permite listar algumas conclusões principais. (i) flagelina é um potente adjuvante para a ativação de respostas imunológicas humorais, e para esse fim, não há necessidade de fusão ao antígeno heterólogo ou incorporação em sistemas de entrega de antígenos; (ii) a resposta imunológica desencadeada pela flagelina (nas doses de 1-15 µg) é do tipo mixta com predominância do padrão Th2, independentemente da via utilizada; (iii) alguns adjuvantes TLR-dependente ou TLR-independente podem ser administrados junto com a flagelina para modular a resposta imunológica para o padrão Th1; (iv) flagelina exerce efeito adjuvante por inúmeros mecanismos, dentre eles, ativação de APCs, produção de citocinas pró-inflamatórias e direcionamento do antígeno a APCs quando na forma de proteína de fusão; (v) os efeitos imunológicos da inoculação de flagelina são em geral, discretos, o que a torna um adjuvante seguro para uso em humanos; (vi) os mecanismos de

adjuvanticidade da flagelina não são exclusidos de sua ligação ao receptor TLR5, mas podem decorrer de efeitos sobre a ativação de receptores IPAF/Naip5 uma vez que verificamos proteção terapêutica em animais TLR5$^{-/-}$ desafiados com células TC-1; (vii) a utilização de flagelina na forma fusionada ao antígeno é mais eficiente para ativação de linfócitos T CD8^{+} do que a forma co-administrada; (viii) o uso de flagelina como adjuvante para vacinas anti-câncer é controverso pois revela que não existe uma única resposta imunológica ou susceptibilidade de diferentes tumores ao estímulo com flagelina.

Os resultados obtidos demonstram que a flagelina na forma de proteína purificada é capaz promover ativação de células T CD8^{+} antígeno-específica, mas que esta ativação é discreta e provavelmente incapaz de mediar proteção contra patógenos intracelulares ou células tumorais que requerem potente resposta de CTLs. No entanto, os resultados obtidos abrem perspectivas para que este adjuvante possa ser utilizado para tal finalidade desde que algumas modificações sejam realizadas de modo a acentuar suas propriedades adjuvantes, como por exemplo, a fusão genética ao antígeno; a utilização da informação genética (vacinas de DNA); ou a incorporação em sistemas de entrega de antígenos tais como nanopartículas que têm demonstrado efetividade da flagelina para ativação de CTL; ou ainda, a co-administração de outros adjuvantes capazes de modular a resposta da flagelina beneficiando a geração de linfócitos Th1.

No futuro, com a compreensão mais profunda dos mecanismos pelos quais a flagelina promove ativação de respostas celulares, incluindo o papel da ativação de TLR5 em células tumorais e a contribuição da via de sinalização mediada por IPAF/Naip5 para o efeito adjuvante da flagelina, poderemos utilizar este adjuvante para compor formulações vacinais contra doenças virais, bacterianas e as primeiras vacinas contra doenças fúngicas e parasitárias humanas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS[1]

AHN, W. S.; BAE, S. M.; KIM, T. Y.; KIM, T. G.; LEE J. M.; NAMKOONG S.E.; KIM, C.K.; SIN, J.I.. A therapy modality using recombinant IL-12 adenovirus plus E7 protein in a human papillomavirus 16 E6/E7-associated cervical cancer animal model. **Hum. Gene Ther.**, v. 14, n. 15, p. 1389-1399, 2003.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 7, p. 499-511, 2004.

AKIRA, S.; YAMAMOTO, M.; TAKEDA, K. Role of adapters in Toll-like receptor signalling. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 31, n. 3, p. 637-642, 2003.

AMEEN, M.; TALHARI, C.; TALHARI, S. Advances in paracoccidioidomycosis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 35, n. 6, p. 576-850, 2010.

ANDERSEN-NISSEN, E.; SMITH, K. D.; BONNEAU, R.; STRONG, R. K.; ADEREM, A. A conserved surface on Toll-like receptor 5 recognizes bacterial flagellin. **J. Exp. Med.**, v. 204, n. 2, p. 393-403, 2007.

APPLEQUIST, S. E.; ROLLMAN, E.; WAREING, M. D.; LIDEN, M.; ROZELL, B.; HINKULA, J.; LJUNGGREN, H. G. Activation of innate immunity, inflammation, and potentiation of DNA vaccination through mammalian expression of the TLR5 agonist flagellin. **J. Immunol.**, v. 175, n. 6, p. 3882-3891, 2005.

ARMSTRONG, D. J.; ROMAN, A. The anomalous electrophoretic behavior of the human papillomavirus type 16 E7 protein is due to the high content of acidic amino acid residues. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 192, n. 3, p. 1380-1387, 1993.

ARRUDA, C.; FRANCO, M. F.; KASHINO, S. S.; NASCIMENTO, F. R.; FAZIOLI, A.; VAZ, C. A.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by Paracoccidioides brasiliensis but enhances pulmonary inflammation. **Clin. Immunol.**, v. 103, n. 2, p. 185-195, 2002.

AUTRAN, B.; CARCELAIN, G.; COMBADIERE, B.; DEBRE, P. Therapeutic vaccines for chronic infections. **Science**, v. 305, n. 5681, p. 205-208, 2004a.

AUTRAN, B.; COSTAGLIOLA, D.; MURPHY, R.; KATLAMA, C. Evaluating therapeutic vaccines in patients infected with HIV. **Expert. Rev. Vaccines**, v. 3, n. 4, p. 169-177, 2004b.

---

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

BALDRIDGE, J. R.; MCGOWAN, P.; EVANS, J. T.; CLUFF, C.; MOSSMAN, S.; JOHNSON, D.; PERSING, D. Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. **Expert. Opin. Biol. Ther.**, v. 4, n. 7, p. 1129-1138, 2004.

BARBER, D. L.; WHERRY, E. J.; AHMED, R. Cutting edge: rapid in vivo killing by memory CD8 T cells. **J. Immunol.**, v. 171, n. 1, p. 27-31, 2003.

BARGIERI, D. Y.; LEITE, J. A.; LOPES, S. C.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; BRAGA, C. J. M.; FERREIRA, L. C.; SOARES, I. S.; COSTA, F. T.; RODRIGUES, M. M.. Immunogenic properties of a recombinant fusion protein containing the C-terminal 19 kDa of Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 and the innate immunity agonist FliC flagellin of Salmonella typhimurium. **Vaccine**, v. 28, n. 16, p. 2818-2826, 2010.

BARGIERI, D. Y.; ROSA, D. S.; BRAGA, C. J. M.; CARVALHO, B. O.; COSTA, F. T.; ESPINDOLA, N. M.; VAZ, A. J.; SOARES, I. S.; FERREIRA, L. C.; RODRIGUES, M. M. New malaria vaccine candidates based on the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist Salmonella Typhimurium FliC flagellin. **Vaccine**, v. 26, n. 48, p. 6132-6142, 2008.

BATES, J. T.; GRAFF, A. H.; PHIPPS, J. P.; GRAYSON, J. M.; MIZEL, S. B. Enhanced antigen processing of flagellin fusion proteins promotes the antigen-specific CD8+ T cell response independently of TLR5 and MyD88. **J. Immunol.**, v. 186, n. 11, p .6255-6262, 2011.

BEN-YEDIDIA, T.; MARCUS, H.; REISNER, Y.; ARNON, R. Intranasal administration of peptide vaccine protects human/mouse radiation chimera from influenza infection. **Int. Immunol.**, v. 11, n. 7, p. 1043-1051, 1999a.

BEN-YEDIDIA, T.; TARRAB-HAZDAI, R.; SCHECHTMAN, D.; ARNON, R. Intranasal administration of synthetic recombinant peptide-based vaccine protects mice from infection by Schistosoma mansoni. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 9, p. 4360-4366, 1999b.

BERMUDEZ-HUMARAN, L. G.; CORTES-PEREZ, N. G. ; LE LOIR, Y.; GRUSS, A.; RODRIGUEZ-PADILLA, C.; SAUCEDO-CARDENAS, O.; LANGELLA, P.; DE OCA-LUNA, R. Fusion to a carrier protein and a synthetic propeptide enhances E7 HPV-16 production and secretion in Lactococcus lactis. **Biotechnol. Prog.,** v. 19, n. 3, p. 1101-1104, 2003.

BERNARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidiodomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 209-221, 2008.

BOLESTA, E.; GZYL, J.; WIERZBICKI, A.; KMIECIAK, D.; KOWALCZYK, A.; KANEKO, Y.; SRINIVASAN, A.; KOZBOR, D. Clustered epitopes within the Gag-Pol fusion protein DNA vaccine enhance immune responses and protection against

challenge with recombinant vaccinia viruses expressing HIV-1 Gag and Pol antigens. **Virology**, v. 332, n. 2, p. 467-479, 2005.

BORGES-WALMSLEY, M. I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A. R. The pathobiology of Paracoccidioides brasiliensis. **Trends Microbiol**., v. 10, n. 2, p. 80-87, 2002.

BORROW, P.; LEWICKI, H.; HAHN, B. H.; SHAW, G. M.; OLDSTONE, M. B. Virus-specific $CD8^+$ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. **J. Virol.**, v. 68, n. 9, p. 6103-6110, 1994.

BOSCARDIN, S. B.; HAFALLA, J. C.; MASILAMANI, R. F.; KAMPHORST, A. O.; ZEBROSKI, H. A.; RAI, U.; MORROT, A.; ZAVALA, F.; STEINMAN, R. M.; NUSSENZWEIG, R. S.; NUSSENZWEIG, M. C. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. **J. Exp. Med.**, v. 203, n. 3, p. 599-606, 2006.

BOSCH, F. X.; MANOS, M. M.; MUNOZ, N.; SHERMAN, M.; JANSEN, A. M.; PETO, J.; SCHIFFMAN, M. H.; MORENO, V.; KURMAN, R.; SHAH, K. V. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 87, n. 11, p .796-802, 1995.

BRAGA, C. J. M.; MASSIS, L. M.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; ALENCAR, B. C.; BARGIERI, D. Y.; BOSCARDIN, S. B.; RODRIGUES, M. M.; FERREIRA, L. C. $CD8^+$ T cell adjuvant effects of Salmonella FliCd flagellin in live vaccine vectors or as purified protein. **Vaccine**, v. 28, n. 5, p. 1373-1382. 2010.

BRAGA, C. J. M., RITTNER, G. M.; MUNOZ-HENAO, J. E.; TEIXEIRA, A. F.; MASSIS, L. M.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; TABORDA, C. P.; TRAVASSOS, L. R.; FERREIRA, L. C. Paracoccidioides brasiliensis vaccine formulations based on the gp43-derived P10 sequence and the Salmonella enterica FliC flagellin. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 4, p. 1700-1707, 2009.

BRAGA, C. J. M.; MASSIS, L. M.; ALENCAR, B. C. G.; MAURÍCIO, M. R.; SBRGOGIO-ALMEIDA. M. E.; FERREIRA, L. C. S. Cytotoxic T Cell Adjuvant Effects of Three Salmonella enteric flagellin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 44-49, 2008.

BRASIL (2011). Casos confirmados de Malária. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2009* (dados referentes a notificações realizadas até o mês de dezembro). Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Casos_confirmados_malaria_90a09_serie_historica.pdf. [17 agosto de 2011]

BROWN, D. R.; SHEW, M. L.; QADADRI, B.; NEPTUNE, N.; VARGAS, M.; TU, W.; JULIAR, B. E.; BREEN, T. E.; FORTENBERRY, J. D. A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. **J. Infect. Dis.**, v. 191, n. 2, p. 182-192, 2005.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v .6, n. 2, p. 89-117, 1993.

CAI, Z.; SANCHEZ, A.; SHI, Z.; ZHANG, T.; LIU, M.; ZHANG, D. Activation of Toll-like receptor 5 on breast cancer cells by flagellin suppresses cell proliferation and tumor growth. **Cancer Res**., v. 71, n. 7, p. 2466-2475, 2011.

CALICH, V. L.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of Paracoccidioides brasiliensis infection. **Braz. J. Med. Biol. Res**., v. 31, n. 5, p. 615-623, 1998.

CANO, L. E.; KASHINO, S. S.; ARRUDA, C.; ANDRE, D.; XIDIEH, C. F.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A.; BURGER, E.; CALICH, V. L. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 2, p. 800-806, 1998.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 5, p. 1777-1783, 1995.

CHANG, Y. C.; MADKAN, V.; COOK-NORRIS, R.; SRA, K.; TYRING, S. Current and potential uses of imiquimod. **South Med. J.**, v. 98, n. 9, p. 914-920, 2005.

CHU, N. R.; WU, H. B.; WU, T.; BOUX, L. J.; SIEGEL, M. I.; MIZZEN, L. A. Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumour by administration of fusion protein comprising Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin (BCG) hsp65 and HPV16 E7. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 121, n. 2, p. 216-225, 2000.

CHUNG, N. P.; CHEN, Y.; CHAN, V. S.; TAM, P. K.; LIN, C. L. Dendritic cells: sentinels against pathogens. **Histol. Histopathol.**, v. 19, n. 1, p. 317-324, 2004.

CID-ARREGUI, A.; JUAREZ, V.; ZUR-HAUSEN, H. A synthetic E7 gene of human papillomavirus type 16 that yields enhanced expression of the protein in mammalian cells and is useful for DNA immunization studies. **J. Virol.**, v. 77, n. 8, p. 4928-4937, 2003.

COLOMBO, A. L.; TOBON, A.; RESTREPO, A.; QUEIROZ-TELLES, F.; NUCCI, M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Med. Mycol.**, v. 2, p. 23-26, 2011.

CRELLIN, N. K.; GARCIA, R. V.; HADISFAR, O.; ALLAN, S. E.; STEINER, T. S.; LEVINGS, M. K.. Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. **J. Immunol.**, v. 175, n. 12, p. 8051-8059, 2005.

CUADROS, C.; LOPEZ-HERNANDEZ, F. J.; DOMINGUEZ, A. L.; M. MCCLELLAND, M.; LUSTGARTEN, J. Flagellin fusion proteins as adjuvants or vaccines induce specific immune responses. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 5, p. 2810-2816, 2004.

CULIG, Z. Cytokine disbalance in commun human cancers. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1813, n. 2, p. 308-314, 2011.

CUNNINGHAM, A. F.; KHAN, M.; BALL, J.; TOELLNER, K. M.; SERRE, K.; MOHR, E.; MACLENNAN, I. C. Responses to the soluble flagellar protein FliC are Th2, while those to FliC on Salmonella are Th1. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, n. 11, p. 2986-2995, 2004.

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

DE VILLIERS, E. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H. U.; ZUR, H. HAUSEN. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

DIDIERLAURENT, A.; FERRERO, I.; OTTEN, L. A.; DUBOIS, B.; REINHARDT, M.; CARLSEN, H.; BLOMHOFF, R.; AKIRA, S.; KRAEHENBUHL, J. P.; SIRARD, J. C. Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. **J. Immunol.**, v. 172, n. 11, p. 6922-6930, 2004.

DINIZ, M. O. **Avaliação da resposta imunológica e protetora de uma vacina de DNA contra tumores induzidos por HPV-16.** 2010. 171 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

DINIZ, M. O.; LASARO, M. O.; ERTL, H. C.; FERREIRA, L. C. Immune responses and therapeutic antitumor effects of an experimental DNA vaccine encoding human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to herpesvirus glycoprotein D. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 17, n. 10, p. 1576-1583, 2010.

DITTMER, U.; OLBRICH, A. R. Treatment of infectious diseases with immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 6, n. 5, p. 472-477, 2003.

DUPUIS, M.; DENIS-MIZE, K.; LABARBARA, A.; PETERS, W.; CHARO, I. F.; MCDONALD, D. M.; OTT, G. Immunization with the adjuvant MF59 induces macrophage trafficking and apoptosis. **Eur. J. Immunol.**, v.31, n.10, p. 2910-2918, 2001.

DYSON, N.; HOWLEY, P. M.; MUNGER, K.; HARLOW, E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, v. 243, n. 4893, p. 934-937, 1989.

FAHAM, A.; ALTIN, J. G. Antigen-containing liposomes engrafted with flagellin-related peptides are effective vaccines that can induce potent antitumor immunity and immunotherapeutic effect. **J. Immunol.**, v. 185, n. 3, p. 1744-1754, 2010.

FELTKAMP, M. C.; SMITS, H. L.; VIERBOOM, M. P.; MINNAAR, R. P.; DE JONGH, B. M.; DRIJFHOUT, J. W.; TER SCHEGGET, J.; MELIEF, C. J.; KAST, W. M. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, n. 9, p. 2242-2249, 1993.

FLYNN, J. L.; WEISS, W. R.; NORRIS, K. A.; SEIFERT, H. S.; KUMAR, S.; SO, M. Generation of a cytotoxic T-lymphocyte response using a Salmonella antigen-delivery system. **Mol. Microbiol.**, v. 4, n. 12, p. 2111-2118, 1990.

FU, J. L.; XU, D. P.; ZHAO, P.; CHEN, L. M.; ZHANG, H.; ZHOU, C. B.; YAO, J. X. RONG, Y. H.; WANG., F. S. The characterization of regulatory T cells in peripheral blood of HBV-infected patients. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 86, n. 22, p. 1522-1525. 2006.

GAHERY-SEGARD, H.; PIALOUX, G.; FIGUEIREDO, S.; IGEA, C.; SURENAUD, M.; GASTON, J.; GRAS-MASSE, H.; LEVY; J. P.; GUILLET, J. G. Long-term specific immune responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide vaccine: characterization of CD8+-T-cell epitopes recognized. **J. Virol.**, v. 77, n. 20, p.11220-11231, 2003.

GARLAND, S. M.; STEBEN, M.; HERNANDEZ-AVILA, M.; KOUTSKY, L. A.; WHEELER, C. M.; PEREZ, G.; HARPER, D. M.; LEODOLTER, S.; TANG, G. W.; FERRIS, D. G.; ESSER, M. T.; VUOCOLO, S. C.; NELSON, M.; RAILKAR, R.; SATTLER, C.; BARR, E. Noninferiority of antibody response to human papillomavirus type 16 in subjects vaccinated with monovalent and quadrivalent L1 virus-like particle vaccines. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, n. 6, p. 792-795, 2007.

GIUDICE, G. D. E. F.; BUGARINI, R.; HORA, M.; HENRIKSSON, T.; PALLA, E.; O'HAGAN, D.; DONNELLY, J.; RAPPUOLI, R.; PODDA, A. Vaccines with the MF59 Adjuvant Do Not Stimulate Antibody Responses against Squalene **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 9, p. 1010-1014, 2006.

GOLDSTONE, S. E.; PALEFSKY, J. M.; WINNETT, M. T.; NEEFE, J. R. Activity of HspE7, a novel immunotherapy, in patients with anogenital warts. **Dis. Colon Rectum.**, v. 45, n. 4, p. 502-507, 2002.

GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G.; NAKAYA, Y.; MOLANO, A.; DY, E.; ESTEBAN, M.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J. R.; PALESE, P.; GARCIA-SASTRE, A.; NUSSENZWEIG, R. S. Induction of protective immunity against malaria by priming-boosting immunization with recombinant cold-adapted influenza and modified vaccinia Ankara viruses expressing a CD8+-T-cell epitope derived from the circumsporozoite protein of Plasmodium yoelii. **J. Virol.**, v. 77, n. 21, p. 11859-1166, 2003.

GUDMUNDSDOTTER, L.; BERNASCONI, D.; HEJDEMAN, B.; SANDSTROM, E.; ALAEUS, A.; LIDMAN, K.; ENSOLI, B.; WAHREN, B.; BUTTO, S. Cross-clade immune responses to Gag p24 in patients infected with different HIV-1 subtypes and correlation with HLA class I and II alleles. **Vaccine**, v. 26, n. 40, p. 5182-5187, 2008.

GUNN, G. R.; ZUBAIR, A.; PETERS, C.; PAN, Z. K.; WU, T. C.; PATERSON, Y. Two Listeria monocytogenes vaccine vectors that express different molecular forms of human papilloma virus-16 (HPV-16) E7 induce qualitatively different T cell immunity that correlates with their ability to induce regression of established tumors immortalized by HPV-16. **J. Immunol.**, v. 167, n. 11, p. 6471-6479, 2001.

HARIHARAN, K.; BRASLAWSKY, G.; BARNETT, R. S.; BERQUIST, L. G.; HUYNH, T.; HANNA, N.; BLACK, A. Tumor regression in mice following vaccination with human papillomavirus E7 recombinant protein in PROVAX. **Int. J. Oncol.**, v. 12, n. 6, p. 1229-1235, 1998.

HARPER, D. M.; FRANCO, E. L.; WHEELER, C.; FERRIS, D. G.; JENKINS, D.; SCHUIND, A.; ZAHAF, T.; INNIS, B.; NAUD, P.; DE CARVALHO, N. S.; ROTELI-MARTINS, C. M.; TEIXEIRA, J.; BLATTER, M. M.; KORN, A. P.; QUINT, W.; DUBIN, G. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 364, n. 9447, p. 1757-1765, 2004.

HARPER, D. M.; FRANCO, E. L.; WHEELER, C. M.; MOSCICKI, .A. B.; ROMANOWSKI, B.; ROTELI-MARTINS, C. M.; JENKINS, D.; SCHUIND, A.; COSTA CLEMENS S. A.; DUBIN, G. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. **Lancet**, v. 367, n. 9518, p. 1247-1255, 2006.

HE, Z.; WLAZLO, A. P.; KOWALCZYK, D. W.; CHENG, J.; XIANG, Z. Q.; GILES-DAVIS, W.; ERTL, H. C. Viral recombinant vaccines to the E6 and E7 antigens of HPV-16. **Virology**, v. 270, n. 1, p. 146-161, 2000.

HONKO, A. N.; MIZEL, S. B. Effects of flagellin on innate and adaptive immunity. **Immunol. Res.**, v. 33, n. 1, p. 83-101, 2005.

HONKO, A. N.; SRIRANGANATHAN, N.; LEES; C. J.; MIZEL, S. B. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with Yersinia pestis. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 2, p. 1113-1120, 2006.

HOWLEY, P. M. Role of the human papillomaviruses in human cancer. **Cancer Res**., v. 51, p. 5019-5022, 1991. Suppl. 18.

HUANG, B.; ZHAO, J.; UNKELESS, J. C.; FENG, Z. H.; XIONG, H. TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. **Oncogene**, v. 27, n. 2, p. 218-224, 2008.

HULEATT, J. W.; JACOBS, A. R.; TANG, J.; DESAI, P.; KOPP, E. B.; HUANG, Y.; SONG, L.; NAKAAR, V.; POWELL, T. J. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. **Vaccine**, v.25, n.4, p.763-775, 2007.

HULEATT, J. W.; NAKAAR, V.; DESAI, P.; HUANG, Y.; HEWITT, D.; JACOBS, A.; TANG, J.; MCDONALD, W.; SONG, L.; EVANS, R. K.; UMLAUF, S.; TUSSEY, L.; POWELL, T. J. Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. **Vaccine**, v. 26, n. 2, p. 201-214, 2008.

HUNG, C. F.; CHENG, W. F.; HSU, K. F.; CHAI, C. Y.; HE, L.; LING, M.; WU, T. C. Cancer immunotherapy using a DNA vaccine encoding the translocation domain of a bacterial toxin linked to a tumor antigen. **Cancer Res.**, v. 61, n. 9, p. 3698-3703, 2001.

JAHRSDORFER, B.; MUHLENHOFF, L.; BLACKWELL, S. E.; WAGNER, M.; POECK, H.; HARTMANN, E.; JOX, R.; GIESE, T.; EMMERICH, B.; ENDRES, S.; WEINER, G. J.; HARTMANN, G. B-cell lymphomas differ in their responsiveness to CpG oligodeoxynucleotides. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, n. 4, p. 1490-1499, 2005.

JAHRSDORFER, B.; WOOLDRIDGE, J. E.; BLACKWELL, S. E.; TAYLOR, C. M.; GRIFFITH, T. S.; LINK, B. K.; WEINER, G. J. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides induce apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia cells. **J. Leukoc. Biol.**, v. 77, n. 3, p. 378-387, 2005.

JEON, S. H.; BEN-YEDIDIA, T.; ARNON, R. Intranasal immunization with synthetic recombinant vaccine containing multiple epitopes of influenza virus. **Vaccine**, v. 20, n. 21-22, p. 2772-2780, 2002.

JONES, T. R.; HOFFMAN, S. L. Malaria vaccine development. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 7, n. 3, p. 303-310, 1994.

KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1589, n. 1, p. 1-13, 2002.

KANODIA, S.; FAHEY, L. M.; KAST, W. M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. Curr. Cancer Drug Targets, v.7, p. 79-89, 2007.

KANZLER, H.; BARRAT, F. J.; HESSEL E. M.; COFFMAN,R. L. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. **Nat. Med.**, v. 13, n. 5, p. 552-559, 2007.

KAPPE, S. H.; BUSCAGLIA, C. A.; NUSSENZWEIG, V. Plasmodium sporozoite molecular cell biology. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 20, p. 29-59, 2004.

KRIEG, A. M. Toll-free vaccines? **Nat. Biotechnol.**, v. 25, n. 3, p. 303-305, 2007.

KURTS, C.; ROBINSON, B. W.; KNOLLE, P. A. Cross-priming in health and disease. **Nat. Rev. Immu**nol., v. 10, n. 6, p. 403-414, 2010.

LAL, R. B.; CHAKRABARTI, S.; YANG, C. Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development. **Indian J. Med. Res.**, v. 121, n. 4, p. 287-314, 2005.

LASARO, M. O.; DINIZ, M. O.; REYES-SANDOVAL, A.; ERTL, H. C.; FERREIRA, L. C. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1. **Microbes Infect.**, v. 7, n. 15, p. 1541-1550, 2005.

LASARO, M. O. e H. C. ERTL. Potentiating vaccine immunogenicity by manipulating the HVEM/BTLA pathway and other co-stimulatory and co-inhibitory signals of the immune system. **Hum. Vaccin.**, v. 5, n. 1, p. 6-14, 2009.

LEE, C. M.; CHANG, P. P.; TSAI, S. C.; ADAMIK, R.; PRICE, S. R.; KUNZ, B. C.; MOSS, J.; TWIDDY, E. M.; HOLMES, R. K. Activation of Escherichia coli heat-labile enterotoxins by native and recombinant adenosine diphosphate-ribosylation factors, 20-kD guanine nucleotide-binding proteins. **J. Clin. Invest.**, v. 87, n. 5, p. 1780-1786, 1991.

LEE, S. E.; KIM, S. Y.; JEONG, B. C.; KIM, Y. R.; BAE, S. J.; AHN, O. S.; LEE, J. J.; SONG, H. C.; KIM, J. M.; CHOY, H. E.; CHUNG, S. S.; KWEON; M. N.; RHEE, J. H. A bacterial flagellin, Vibrio vulnificus FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 1, p. 694-702, 2006.

LETRAN, S. E.; LEE, S. J.; ATIF, S. M.; UEMATSU, S.; AKIRA, S., MCSORLEY, S. J. TLR5 functions as an endocytic receptor to enhance flagellin-specific adaptive immunity. **Eur. J. Immunol.**, v. 41, n. 1, p. 29-38, 2011.

LI, S.; RODRIGUES, M.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J. R.; ESTEBAN, M.; PALESE, P.; NUSSENZWEIG, R. S.; ZAVALA, F. Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 11, p. 5214-5218, 1993.

LIGHTFIELD, K. L.; PERSSON, J.; BRUBAKER, S. W.; WITTE, C. E.; VON MOLTKE, J.; DUNIPACE, E. A.; HENRY, T.; SUN, Y. H.; CADO, D.; DIETRICH, W. F.; MONACK, D. M.; TSOLIS, R. M.; VANCE, R. E. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. **Nat. Immunol.,** v. 9, n. 10, p. 1171-1178, 2008.

LIN, K. Y.; GUARNIERI, F. G.; STAVELEY-O'CARROLL, K. F.; LEVITSKY, H. I.; AUGUST, J. T.; PARDOLL, D. M.; WU, T. C. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. **Cancer Res.**, v. 56, n. 1, p. 21-26, 1996.

LUNA, M. G.; MARTINS, M. M.; NEWTON, S. M.; COSTA, S. O.; ALMEIDA, D. F.; FERREIRA, L. C. Cloning and expression of colonization factor antigen I (CFA/I) epitopes of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) in Salmonella flagellin. **Res. Microbiol.**, v. 148, n. 3, p. 217-228, 1997.

LYCKE, N. Is the choice of vaccine adjuvant critical for long-term memory development? **Expert. Rev. Vaccines**, v. 9, n. 12, p. 1357-1361, 2010.

MARQUES, A. F.; DA SILVA, M. B.; JULIANO, M. A.; MUNHOZ, J. E.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeasts of Paracoccidioides brasiliensis. **Microbes Infect.**, v. 10, n. 12-13, p. 1251-1258, 2008.

MARQUES, A. F.; DA SILVA, M. B.; JULIANO, M. A.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of Paracoccidioides brasiliensis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 8, p. 2814-2819, 2006.

MASSIS, L. M.; BRAGA, C. J.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; LAUAND, C.; NEWTON, S. M., KLEBBA, P. E.; FERREIRA, L. C. Anti-flagellin antibody responses elicited in mice orally immunized with attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium vaccine strains. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 6, p. 606-610, 2008.

MCCANCE, D. J. Human papillomaviruses and cervical cancer. **J. Med. Microbiol.,** v. 47, n. 5, p. 371-373. 1998.

MCEWEN, J.; LEVI, R.; HORWITZ, R. J.; ARNON, R. Synthetic recombinant vaccine expressing influenza haemagglutinin epitope in Salmonella flagellin leads to partial protection in mice. **Vaccine**, v. 10, n. 6, p. 405-411, 1992.

MCMICHAEL, A. J. HIV vaccines. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 24, p. 227-2255, 2006.

MCMURRAY, H. R.; NGUYEN, D., WESTBROOK, T. F., MCANCE, D. J. Biology of human papillomaviruses. **Int. J. Exp. Pathol.,** v. 82, n. 1, p. 15-33, 2001.

MCSORLEY, S. J.; COOKSON, B. T., JENKINS, M. K. Characterization of CD4+ T cell responses during natural infection with Salmonella typhimurium. **J. Immunol.**, v. 164, n. 2, p. 986-993, 2000.

MCSORLEY, S. J.; EHST, B. D.; YU, Y.; GEWIRTZ, A. T. Bacterial flagellin is an effective adjuvant for CD4+ T cells in vivo. **J. Immunol.**, v. 169, n. 7, p. 3914-3919, 2002.

MCSORLEY, S. J.; JENKINS, M. K. Antibody is required for protection against virulent but not attenuated Salmonella enterica serovar typhimurium. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 6, p. 3344-3348, 2000.

MENDES-GIANNINI, M. J.; MONTEIRO, S. J. L.; DE FATIMA, S. J.; DONOFRIO, F. C.; MIRANDA, E. T.; ANDREOTTI, P. F.; SOARES, C. P. Interactions of Paracoccidioides brasiliensis with host cells: recent advances. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 237-248, 2008.

MIAO, E. A.; ANDERSEN-NISSEN, E.; WARREN, S. E.; ADEREM, A. TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. **Semin. Immunopathol.**, v. 29, n. 3, p. 275-288, 2007.

MIYAHIRA, Y.; MURATA, K.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J. R.; ESTEBAN, M.; RODRIGUES, M. M.; ZAVALA, F. Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. **J. Immunol. Methods.**, v. 181, n. 1, p. 45-54, 1995.

MIYAJI, E. N.; CARVALHO, E.; OLIVEIRA, M. L.; RAW, I.; HO, P. L. Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 44, n. 6, p. 500-513, 2011.

MIZEL, S. B.; GRAFF, A. H.; SRIRANGANATHAN, N.; ERVIN, S., LEES, C. J.; LIVELY, M. O.; HANTGAN, R. R.; THOMAS, M. J.; WOOD, J.; BELL, B. Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 16, n. 1, p. 21-28, 2009.

MIZEL, S. B.; HONKO, A. N.; MOORS, M. A.; SMITH, P. S.; WEST, A. P. Induction of macrophage nitric oxide production by Gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric Toll-like receptor 5/Toll-like receptor 4 complexes. **J. Immunol.**, v. 170, n. 12, p. 6217-6223, 2003.

MUNOZ, N.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSE, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUE, X.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J.; MEIJER, C. J. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, n. 6, p. 518-527, 2003.

MURTHY, K. G.; DEB, A.; GOONESEKERA, S.; SZABO, C.; SALZMAN, A. L. Identification of conserved domains in Salmonella muenchen flagellin that are essential for its ability to activate TLR5 and to induce an inflammatory response in vitro. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 7, p. 5667-5675, 2004.

NEAD, M. A.; BAGLIA, L. A.; ANTINORE, M. J.; LUDLOW, J. W.; MCCANCE, D. J. Rb binds c-Jun and activates transcription. **EMBO J.**, v. 17, n. 8, p. 2342-2352, 1998.

NEWTON, S. M.; JACOB, C. O.; STOCKER, B. A. Immune response to cholera toxin epitope inserted in Salmonella flagellin. **Science**, v. 244, n. 4900, p. 70-72, 1989.

NEWTON, S. M.; KOTB, M.; POIRIER, T. P.; STOCKER, B. A.; BEACHEY, E. H. Expression and immunogenicity of a streptococcal M protein epitope inserted in Salmonella flagellin. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 6, p. 2158-2165, 1991a.

NEWTON[b], S. M.; WASLEY, R. D.; WILSON, A.; ROSENBERG, L. T.; MILLER, J. F.; STOCKER, B. A. Segment IV of a Salmonella flagellin gene specifies flagellar antigen epitopes. **Mol. Microbiol.**, v. 5, n. 2. p. 419-425, 1991.

NEWTON, S. M.; C. Joys, T.M.; ANDERSON, S. A.; KENNEDY, R. C.; HOVI, M. E.; STOCKER, B. D. A. Expression and immunogenicity of an 18-residue epitope of HIV1 gp41 inserted in the flagellar protein of Salmonella live vaccine. **Res. Microbiol.**, v. 146, p. 203-216, 1995.

NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R. S. Development of a sporozoite malaria vaccine. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 35, n. 4, p. 678-688, 1986.

_____. Rationale for the development of an engineered sporozoite malaria vaccine. **Adv. Immunol.**, v. 45, p. 283-334, 1989.

O'HAGAN, D. T.; RAPPUOLI, R. The safety of vaccines**. Drug Discov. Today**, v. 9, n. 19, p. 846-854, 2004.

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

OGG, G. S.; JIN, X.; BONHOEFFER, S.; DUNBAR, P. R.; NOWAK, M. A.; MONARD, S.; SEGAL, J. P.; CAO, Y.; ROWLAND-JONES, S. L.; CERUNDOLO, V.; HURLEY, A.; MARKOWITZ, M.; HO, D. D.; NIXON, D. F.; MCMICHAEL, A. J. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. **Science**, v. 279, n. 5359, p. 2103-2106, 1998.

OKADA, E.; SASAKI, S.; ISHII, N.; AOKI, I.; YASUDA, T.; NISHIOKA, K.; FUKUSHIMA, J.; MIYAZAKI, J.; WAHREN, B.; OKUDA, K. Intranasal immunization of a DNA vaccine with IL-12- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-expressing plasmids in liposomes induces strong mucosal and cell-mediated immune responses against HIV-1 antigens**. J. Immunol.**, v. 159, n. 7, p.3638-3547, 1997.

PAAVONEN, J. Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer and related genital neoplasias. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 11, p. 3-9, 2007, Suppl 2.

PASHINE, A.; VALIANTE, N. M.; ULMER, J. B. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants**. Nat. Med.**, v. 11, n. 4, p. 63-68, 2005.

PENG, G.; GUO, Z.; KINIWA, Y., VOO, K. S.; PENG, W.; FU, T.; WANG, D. Y.; LI, Y.; WANG, H. Y.; WANG, R. F. Toll-like receptor 8-mediated reversal of $CD4^+$ regulatory T cell function. **Science**, v. 309, n. 5739, p.1380-1384, 2005.

PINO, O.; MARTIN, M.; MICHALEK, S. M. Cellular mechanisms of the adjuvant activity of the flagellin component FljB of Salmonella enterica Serovar Typhimurium to potentiate mucosal and systemic responses. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 10, p. 6763-6770, 2005.

RAMOS, H. C.; RUMBO, M.; SIRARD, J. C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. **Trends Microbiol.**, v. 12, n. 11, p. 509-517, 2004.

RAVINDRAN, R.; MCSORLEY, S. J. Tracking the dynamics of T-cell activation in response to Salmonella infection. **Immunology,** v. 114, n. 4, p. 450-458, 2005.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTANEDA, E. The habitat of Paracoccidioides brasiliensis: how far from solving the riddle? **Med. Mycol.**, v. 39, n. 3, p. 233-241, 2001.

RHEE, S. H.; IM, E.; POTHOULAKIS, C. Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer. **Gastroenterology**, v. 135, n. 2, p. 518-528, 2008.

RODRIGUES, M. M.; CORDEY, A. S.; ARREAZA, G.; CORRADIN, G.; ROMERO, P.; MARYANSKI, J. L.; NUSSENZWEIG, R. S.; ZAVALA, F. CD8+ cytolytic T cell clones derived against the Plasmodium yoelii circumsporozoite protein protect against malaria. **Int. Immunol.**, v. 3, n. 6, p. 579-585, 1991.

ROMAN, M.; MARTIN-OROZCO, E.; GOODMAN, J. S.; NGUYEN, M. D.; SATO, Y.; RONAGHY, A.; KORNBLUTH, R. S.; RICHMAN, D. D.; CARSON, D. A.; RAZ, E. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. **Nat. Med.**, v. 3, n. 8, p. 849-854, 1997.

ROMERO, P.; MARYANSKI, J. L.; CORRADIN, G.; NUSSENZWEIG, R. S.; NUSSENZWEIG, V.; ZAVALA, F. Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. **Nature**, v. 341, n. 6240, p. 323-326. 1989.

ROSENBERG, E. S.; BILLINGSLEY, J. M.; CALIENDO, A. M.; BOSWELL, S. L.; SAX, P. E.; KALAMS, S. A.; WALKER, B. D. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. **Science**, v. 278, n. 5342, p. 1447-1450, 1997.

RYDBERG, C.; MANSSON, A.; UDDMAN, R.; RIESBECK, K.; CARDELL, L. O. Toll-like receptor agonists induce inflammation and cell death in a model of head and neck squamous cell carcinomas. **Immunology**, v. 128, n. 1, p. 600-611, 2009.

SALAUN, B.; COSTE, I.; RISSOAN, M. C.; LEBECQUE, S. J.; RENNO, T. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. **J. Immunol.**, v. 176, n. 8, p. 4894-4901, 2006.

SALMAN, H. H.; IRACHE, J. M.; GAMAZO, C. Immunoadjuvant capacity of flagellin and mannosamine-coated poly(anhydride) nanoparticles in oral vaccination. **Vaccine**, v. 27, n. 35, p. 4784-4790, 2009.

SAN-BLAS, G.; NINO-VEJA, G.; ITURRIAGA, T. Paracoccidioides brasiliensis and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol.**, v. 40, n. 3, p. 225-242, 2002.

SASSER, A. K.; SULLIVAN, N. J.; STUDEBAKER, A. W.; HENDEY, L. F.; AXEL, A. E.; HALL, B. M. Interleukin-6 is a potent growth factor for ER-alpha-positive human breast cancer. **FASEB J.**, v. 21, n. 13, p. 3763-3770, 2007.

SCHWARTZ, S. A.; HERNANDEZ, A.; MARK E. B. The role of NF-kappaB/IkappaB proteins in cancer: implications for novel treatment strategies. **Surg. Oncol.,** v. 8, n. 3, p. 143-153, 1999.

SCHWARZ, K.; STORNI, T.; MANOLOVA, V.; DIDIERLAURENT, A.; SIRARD, J. C.; ROTHLISBERGER, P.; BACHMANN, M. F. Role of Toll-like receptors in costimulating cytotoxic T cell responses. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, n. 6, p. 1465-1470, 2003.

SEDEGAH, M.; JONES, T. R.; KAUR, M.; HEDSTROM, R.; HOBART, P.; TINE, J. A.; HOFFMAN, S. L. Boosting with recombinant vaccinia increases immunogenicity and protective efficacy of malaria DNA vaccine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 13, p. 7648-7653, 1998.

SEDEGAH, M.; WEISS, W.; SACCI JR., J. B.; CHAROENVIT, Y. ; HEDSTROM, R.; GOWDA, K.; MAJAM, V. F.; TINE, J.; KUMAR, S.; HOBART, P.; HOFFMAN, S. L. Improving protective immunity induced by DNA-based immunization: priming with antigen and GM-CSF-encoding plasmid DNA and boosting with antigen-expressing recombinant poxvirus. **J. Immunol.,** v. 164, n. 11, p. 5905-5912, 2000.

SFONDRINI, L.; ROSSINI, A.; BESUSSO, D.; MERLO, A.; TAGLIABUE, E.; MENARD, S.; BALSARI, A. Antitumor activity of the TLR-5 ligand flagellin in mouse models of cancer. **J. Immunol**., v. 176, n. 11, p. 6624-6630, 2006.

SHEN, W. H.; ZHOU, J. H.; BROUSSARD, S. R.; FREUND, G. G.; DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Proinflammatory cytokines block growth of breast cancer cells by impairing signals from a growth factor receptor. **Cancer Res.**, v. 62, n. 16, p. 4746-4756, 2002.

SHIROTA, H.; KLINMAN, D. M. CpG-conjugated apoptotic tumor cells elicit potent tumor-specific immunity. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 60, n. 5, p. 659-669, 2011.

SKOUNTZOU, I.; MARTIN MDEL, P.; WANG, B.; YE, L.; KOUTSONANOS, D.; WELDON, W.; JACOB, J.; COMPANS, R. W. Salmonella flagellins are potent adjuvants for intranasally administered whole inactivated influenza vaccine. **Vaccine**, v. 28, n. 24, p. 4103-4112, 2009.

SLEASMAN, J. W.; GOODENOW, M. M. 13 HIV-1 infection. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111, p. 582-592, 2003. Suppl. 2.

SOARES, I. S. e M. M. RODRIGUES. Malaria vaccine: roadblocks and possible solutions. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, n. 3, p. 317-332, 1998.

SONG, L.; ZHANG, Y.; YUN, N. E.; POUSSARD, A. L.; SMITH, J. N.; SMITH, J. K.; BORISEVICH, V.; LINDE, J. J.; ZACKS, M. A.; LI, H.; KAVITA, U.; REISEROVA, L.; LIU, X.; DUMUREN, K.; BALASUBRAMANIAN, B.; WEAVER, B.; PARENT, J.; UMLAUF, S.; LIU, G.; HULEATT, J.; TUSSEY, L.; PAESSLER, S. Superior efficacy of a recombinant flagellin:H5N1 HA globular head vaccine is determined by the

placement of the globular head within flagellin. **Vaccine**, v. 27, n. 42, p. 5875-5884, 2009.

SPEISER, D. E.; LIENARD, D.; RUFER, N.; RUBIO-GODOY, V.; RIMOLDI, D.; LEJEUNE, F.; KRIEG, A. M.; CEROTTINI, J. C.; ROMERO, P. Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 3, p. 739-746. 2005.

STEINMAN, R. M.; POPE, M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. **J. Clin. Invest.,** v. 109, n. 12, p. 1519-1526, 2002.

STOCKFLETH, E.; TREFZER, U.; GARCIA-BARTELS, C.; WEGNER, T.; SCHMOOK, T.; STERRY, W. The use of Toll-like receptor-7 agonist in the treatment of basal cell carcinoma: an overview. **Br. J. Dermatol.**, v. 149, p. 53-56, 2003. Suppl 66.

SUN, Y. H.; ROLAN, H. G.; TSOLIS, R. M. Injection of flagellin into the host cell cytosol by Salmonella enterica serotype Typhimurium. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 47, p. 33897-33901, 2007.

SUTMULLER, R. P.; DEN BROK, M. H.; KRAMER, M.; BENNINK, E. J.; TOONEN, L. W.; KULLBERG, B. J.; JOOSTEN, L. A.; AKIRA, S.; NETEA, M. G.; ADEMA, G. J. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. **J. Clin. Invest.**, v. 116, n. 2, p. 485-494, 2006.

TABIASCO, J.; DEVEVRE, E.; RUFER, N.; SALAUN, B.; CEROTTINI, J. C.; SPEISER, D.; ROMERO, P. Human effector CD8+ T lymphocytes express TLR3 as a functional coreceptor. **J. Immunol.**, v. 177, n. 12, p. 8708-8713, 2006.

TABORDA, C. P.; JULIANO, M. A.; PUCCIA, R.; FRANCO, M.; TRAVASSOS, L. R. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of Paracoccidioides brasiliensis which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 2, p. 786-793, 1998.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 335-376, 2003.

TAYLOR, D. N.; TREANOR, J. J.; STROUT, C.; JOHNSON, C.; FITZGERALD, T.; KAVITA, U.; OZER, K.; TUSSEY, L.; SHAW, A. Induction of a potent immune response in the elderly using the TLR-5 agonist, flagellin, with a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine (VAX125, STF2.HA1 SI). **Vaccine,** v. 29, n. 31, p. 4897-4902, 2011.

TREANOR, J. J.; TAYLOR, D. N.; TUSSEY, L.; HAY, C.; NOLAN, C.; FITZGERALD, T.; LIU, G.; KAVITA, U.; SONG, L.; DARK, I.; SHAW, A.. Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine (VAX125) in healthy young adults. **Vaccine**, v. 28, n. 52, p. 8268-8274. 2010

TSUJI, M.; ZAVALA, F. T cells as mediators of protective immunity against liver stages of Plasmodium. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 2, p. 88-93, 2003.

TURLEY, C. B.; RUPP, R. E.; JOHNSON, C.; TAYLOR, D. N.; WOLFSON, J.; TUSSEY, L.; KAVITA, U.; STANBERRY, L.; SHAW, A. Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults. **Vaccine**, v. 29, n. 32, p. 5145-5152, 2011.

VERMA, N. K.; ZIEGLER, H. K.; STOCKER, B. A.; SCHOOLNIK, G. K. Induction of a cellular immune response to a defined T-cell epitope as an insert in the flagellin of a live vaccine strain of Salmonella. **Vaccine**, v. 13, n. 3, 235-244, 1995.

VON KNEBEL, D. M.; RITTMULLER, C.; AENGENEYNDT, F.; JANSEN-DURR, P.; SPITKOVSKY, D. Reversible repression of papillomavirus oncogene expression in cervical carcinoma cells: consequences for the phenotype and E6-p53 and E7-pRB interactions. **J. Virol.**, v. 68, n. 5, p. 2811-2821, 1994.

WANG, B. Z.; QUAN, F. S.; KANG, S. M.; BOZJA, J.; SKOUNTZOU, I.; COMPANS, R. W. Incorporation of membrane-anchored flagellin into influenza virus-like particles enhances the breadth of immune responses. **J. Virol.**, v. 82, n. 23, p. 11813-11823, 2008.

WATERS, A. P.; MOTA, M. M.; VAN DIJK, M. R.; JANSE, C. J. Parasitology. Malaria vaccines: back to the future? **Science**, v. 307, n. 5709, p. 528-530, 2005.

WEI, L. N.; JOYS, T. M. Covalent structure of three phase-1 flagellar filament proteins of Salmonella. **J. Mol. Biol.**, v. 186, n. 4, p. 791-803, 1985.

WEISS, W. R.; SEDEGAH, M.; BEAUDOIN, R. L.; MILLER, L. H.; GOOD, M. F. CD8+ T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 85, n. 2, p. 573-576, 1988.

WERNESS, B. A.; LEVINE, A. J.; HOWLEY, P. M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science**, v. 248, n. 4951, p. 76-79, 1990.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. The global malaria situation: current tools for prevention & control. 55th. World Health Assembly. Global Fund to Fight AIDS, Tuberculosis & Malaria, WHO document no. 55. 2002. Available from: http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA55/ea55id6.pdf. [2011 ago 14]

YONEKURA, K.; MAKI-YONEKURA. S.; NAMBA, K. Growth mechanism of the bacterial flagellar filament. **Res. Microbiol.**, v. 153, n. 4, p. 191-197, 2002.

_____. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. **Nature**, v. 424, n. 6949, p. 643-650, 2003.

YU, L.; CHEN, S. Toll-like receptors expressed in tumor cells: targets for therapy. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 57, n. 9, p. 1271-1278, 2008.

ZERFASS, K.; SCHULZE, A.; SPITKOVSKY, D.; FRIEDMAN, V.; HENGLEIN, B.; JANSEN-DURR, P. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation**.** **J. Virol.**, v. 69, n. 10, p. 6389-6399, 1995.

ZHANG, G.; GHOSH, S. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. **J. Clin. Invest.**, v. 107, n. 1, p. 13-19, 2001.

ANEXOS

ANEXO A - Súmula Curricular

Catarina Joelma Magalhães Braga

1) Formação e Títulos:

DOUTORAMENTO
Programa de Pós Graduação em Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas II
Universidade de São Paulo (out/2007 até a presente data)
MESTRADO
Programa de Pós Graduação em Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas II
Universidade de São Paulo (setembro/2005 - agosto/2007)
GRADUAÇÃO
Farmácia
Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem
Universidade Federal do Ceará (agosto/1999 - agosto/2003)

2) Produção Científica

Braga, C.J.M.[a], Rodrigues, J.F.[a], Medina-Armenteros, Y.[a], Farinha-Arcieri, L.E.[a], Ventura. A.M.[a], Boscardin, S.B.[b], Sbrogio-Almeida, M.E.[c], Ferreira, L.C.S.[a*]. Cellular and humoral adjuvant effects of type I heat-labile toxins (LT-I) following parenteral administration to mice. (Manuscrito em construção).

Oliveira, B.H., Silva, M.R., **Braga, C.J.M.**, Massis, L.M., Ferreira, L.C.S., Sbrogio-Almeida, M.E. and Takagi, M. Production and Purification of Flagellin (FliC*i*) from *Salmonella* Typhimurium. Brazilian Journal of Chemical Engineering (2011). 28(4). ISSN 0104-6632. (Artigo no prelo).

Bruna F.M.M. Porchia, Mariana O. Diniz, Francisco A.M.O. Cariri, Vinícius C. Santana, Jaime H. Amorim, Andrea Balan, **Catarina J.M. Braga**, Luís Carlos S. Ferreira. Purified Herpes Simplex Type 1 Glycoprotein D (gD) Genetically Fused with the Type 16 Human Papillomavirus E7 Oncoprotein Enhances Antigen-Specific $CD8^+$ T Cell Responses and Confers Protective Antitumor Immunity. Mol Pharm (2011). DOI: 10.1021/mp200194s.

Daniel Y. Bargieri, Irene S. Soares, Fabio T.M. Costa, **Catarina J.M. Braga**, Luís C.S. Ferreira, and Mauricio M. Rodrigues. Malaria Vaccine Development: Are Bacterial Flagellin Fusion Proteins the Bridge between Mouse and Humans? Journal of Parasitology Research (2011), 2011:1–10.

Catarina J.M. Braga, Liliana M. Massis, Maria E. Sbrogio-Almeida, Bruna C.G. Alencar, Daniel Y. Bargieri, Silvia B. Boscardin, Maurício M. Rodrigues, Luís C.S. Ferreira. $CD8^+$ T cell adjuvant effects of *Salmonella* FliC*d* flagellin in live vaccine vectors or as purified protein. Vaccine (2010), 28:1373-1382.

Daniel Y. Bargieri, Juliana A. Leite, Stefanie C.P. Lopes, Maria E. Sbrogio-Almeida, **Catarina J.M. Braga**, Luís C.S. Ferreira, Irene S. Soares, Fábio T. Costa, Maurício

M. Rodrigues. Immunogenic properties of a recombinant fusion protein containing the C-terminal 19 kDa of *Plasmodium falciparum* merozoita surface protein-1 and the innate immunity agonist FliC flagellin of *Salmonella* Typhimurium. Vaccine (2010), 28:2818-2826.

Catarina J.M. Braga, Glauce M.G. Rittner, Julian E. Munoz Henao, Aline F. Teixeira, Liliana M. Massis, Maria E. Sbrogio-Almeida, Carlos P. Taborda, Luiz R. Travassos and Luís C. S. Ferreira. *Paracoccidioides brasiliensis* Vaccine Formulations Based on the gp-43 Derived P10 sequence and the *Salmonella enterica* FliC Flagellin. Infection and Immunity (2009), 77(4):1700-1707.

Daniel Y. Bargieri, Daniela S. Rosa, **Catarina J.M. Braga**, Bruna O. Carvalho, Fábio T.M. Costa, Noeli M. Espíndola, Adelaide J. Vaz, Irene S. Soares, Luís C.S. Ferreira, Maurício M. Rodrigues. New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella* Typhimurium FliC flagellin. Vaccine (2008), 26:6132-6142.

Catarina J.M. Braga, Liliana M. Massis, Bruna C.G. Alencar, Maurício M. Rodrigues, M. E. Sbrogio-Almeida and Luís C. S. Ferreira. Cytotoxic T cell adjuvant effects of three *Salmonella enterica* flagellins. Brazilian Journal of Microbiology (2008), 39:44-49.

Liliana M. Massis, **Catarina J.M. Braga**, M. E. Sbrogio-Almeida, Camila Lauand, Salete M.C. Newton, PE Klebba and Luís C. S. Ferreira. Anti-flagellin antibody response in mice orally immunized with attenuated Salmonella enteric serovar Typhimurium vaccine strains. Mem. Inst. Oswaldo Cruz (2008), 103(6):606-610.

- **Patentes solicitadas:**

Depósito de Patente de Invenção intitulada “Formulação Farmacêutica Contendo Flagelina Co-administrada e/ou Fusionada a um Peptídeo (P10) e seu Uso”. O pedido de patente foi protocolado com o número 018090044507 em 25/09/09 junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial–I.N.P.I./S.P.

3) Indicadores quantitativos nos últimos 5 anos:

Publicações em periódicos: 07.
Comunicações em congressos e Reuniões: 14 nacionais e 03 internacionais.
Apresentação oral em congressos e Reuniões: 04 nacionais.

4) Outras informações:

- **Prêmios:**

Prêmio Destaque em Publicação Científica - 2010 pelo artigo: $CD8^+$ T cell adjuvant effects of *Salmonella* FliC*d* flagellin in live vaccine vectors or as purified protein. Vaccine (2010), 28:1373-1382; Apresentado durante a X Reunião Científica do Departamento de Microbiologia, da Universidade de São Paulo.

Menção Honrosa em Publicação Científica - 2009 pelo trabalho: *Paracoccidioides brasiliensis* Vaccine Formulations Based on the gp-43 Derived P10 sequence and the *Salmonella enterica* FliC Flagellin. Infection and Immunity (2009), 77(4):1700-1707, Apresentado durante a IX Reunião Científica do Departamento de Microbiologia, da Universidade de São Paulo.

Menção Honrosa pela apresentação do melhor trabalho na Sessão de Temas Livres: Protective Immune Response in mice Immunized with the gp43-derived P10 peptide and *Salmonella enterica* FliCd Flagellin, Apresentado durante o V Congresso do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, em dezembro de 2008.

- **Distinções:**

Distinção Acadêmica *Magna Cum Laude* emitido pela Universidade Federal do Ceará em reconhecimento ao alto desempenho durante os estudos de graduação no curso de Farmácia.

- **Palestras e Aulas:**

Vacinas de Segunda Geração. Aula Apresentada no Curso de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular Lato Sensu do Instituto de Pós-Graduação do Rio de Janeiro em Abril, 2011. Dir. do Instituto: Prof. Dr. Stans Murad-Netto.

Adjuvantes do Tipo Imunopotencializadores. Aula Apresentada no Curso de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular Lato Sensu do Instituto de Pós-Graduação do Rio de Janeiro em Abril, 2011. Dir. do Instituto: Prof. Dr. Stans Murad-Netto.

Adjuvantes do Tipo Sistema de Entrega ou Adjuvantes Particulados. Aula Apresentada no Curso de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular Lato Sensu do Instituto de Pós-Graduação do Rio de Janeiro em Abril, 2011. Dir. do Instituto: Prof. Dr. Stans Murad-Netto.

Vacinas Comestíveis. Aula Apresentada no Curso de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular Lato Sensu do Instituto de Pós-Graduação do Rio de Janeiro em Abril, 2011. Dir. do Instituto: Prof. Dr. Stans Murad-Netto.

Potencial de Flagelinas de Salmonela para Ativação de Linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$. Teórico para o Curso "Novas Tecnologias em Vacinas Recombinantes". Coordenadores: Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira e Dr. Maurício Martins Rodrigues; julho de 2010.

Sistemas de Expressão de Proteínas Recombinantes. Aula teórica e prática para o Curso "Novas Tecnologias em Vacinas Recombinantes". Coordenadores: Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira e Dr. Maurício Martins Rodrigues; julho de 2010.

O Flagelo Bacteriano e Potenciais Aplicações Biotecnológicas. Aula Apresentada para a Disciplina de pós-graduação do Departamento de Microbiologia

da USP. Cód. BMM5829– Estudo do Envoltório Celular de Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas; Coordenador: Rita de Cássia Café Ferreira; agosto de 2010.
Potencial de flagelinas de *Salmonella entérica* para geração de respostas T CD8$^+$ citotóxicas. Palestra apresentada para o Centro de Vacinas e Terapia Gênica (CEVAT-GENE) do Departamento de Microbiologia da USP; agosto de 2007.

Flagelina FliC*d* de *Salmonella entérica* sv Muenchen promove a ativação de células T CD4$^+$ específicas e confere proteção a PCM experimental. Palestra apresentada para o Centro de Vacinas e Terapia Gênica (CEVAT-GENE) do Departamento de Microbiologia da USP; abril de 2008.

Potencial Adjuvante de Flagelinas de *Salmonella enterica sp*. Aula Apresentada para a Disciplina de pós-graduação do Departamento de Microbiologia da USP. Cód. BMM5801– Vacinas e a Microbiologia; Coordenador: Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira; novembro de 2008.

ANEXO B – Artigo Publicado

INFECTION AND IMMUNITY
2009, p. 1700–1707 Vol. 77, N. 4
doi:10.1128/IAI.01470-08

Paracoccidioides brasiliensis Vaccine Formulations Based on the gp43-Derived P10 Sequence and the *Salmonella enterica* FliC Flagellin

Catarina J. M. Braga,[1] Glauce M. G. Rittner,[1] Julian E. Munõz Henao,[1] Aline F. Teixeira,[1] Liliana M. Massis,[1] Maria E. Sbrogio-Almeida,[2] Carlos P. Taborda,[1] Luiz R. Travassos,[3] and Luís C. S. Ferreira[1]*

INFECTION AND IMMUNITY, Apr. 2009, p. 1700–1707 Vol. 77, No. 4
0019-9567/09/$08.00+0 doi:10.1128/IAI.01470-08
Copyright © 2009, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Paracoccidioides brasiliensis Vaccine Formulations Based on the gp43-Derived P10 Sequence and the *Salmonella enterica* FliC Flagellin[▽]

Catarina J. M. Braga,[1] Glauce M. G. Rittner,[1] Julian E. Muñoz Henao,[1] Aline F. Teixeira,[1] Liliana M. Massis,[1] Maria E. Sbrogio-Almeida,[2] Carlos P. Taborda,[1] Luiz R. Travassos,[3] and Luís C. S. Ferreira[1]*

Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil[1]; Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil[2]; and Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil[3]

Received 2 December 2008/Returned for modification 7 January 2009/Accepted 31 January 2009

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous disease caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Anti-PCM vaccine formulations based on the secreted fungal cell wall protein (gp43) or the derived P10 sequence containing a CD4$^+$ T-cell-specific epitope have shown promising results. In the present study, we evaluated new anti-PCM vaccine formulations based on the intranasal administration of *P. brasiliensis* gp43 or the P10 peptide in combination with the *Salmonella enterica* FliC flagellin, an innate immunity agonist binding specifically to the Toll-like receptor 5, in a murine model. BALB/c mice immunized with gp43 developed high-specific-serum immunoglobulin G1 responses and enhanced interleukin-4 (IL-4) and IL-10 levels. On the other hand, mice immunized with recombinant purified flagellins genetically fused with P10 at the central hypervariable domain, either flanked or not by two lysine residues, or the synthetic P10 peptide admixed with purified FliC elicited a prevailing Th1-type immune response based on lung cell-secreted type 1 cytokines. Mice immunized with gp43 and FliC and intratracheally challenged with *P. brasiliensis* yeast cells had increased fungal proliferation and lung tissue damage. In contrast, mice immunized with the chimeric flagellins and particularly those immunized with P10 admixed with FliC reduced *P. brasiliensis* growth and lung damage. Altogether, these results indicate that *S. enterica* FliC flagellin modulates the immune response to *P. brasiliensis* P10 antigen and represents a promising alternative for the generation of anti-PCM vaccines.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a granulomatous disease caused by the thermodimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, which is prevalent in Brazil and other Latin American countries (5, 6, 33). Some individuals develop one of the two main clinical forms of PCM. The acute form is characterized by impaired cellular immunity, negative delayed-type hypersensitivity reactions, increased systemic proliferation of the fungus, and high mortality rate. The chronic form, ranging from mild to severe chronic disease, shows exacerbated host cellular immune responses and formation of granulomas containing fungal cells and may evolve to develop extensive sequelae, including fibrotic lesions and impairment of lung function (33, 39).

Vaccines against PCM are still not available for human use, but promising formulations have been experimentally tested during the last few years. Irradiated *P. brasiliensis* or cellular antigens fractionated by anion-exchange chromatography conferred partial protection against fungal proliferation in the murine model (11). The extracellular gp43 glycoprotein, the major diagnostic antigen of *P. brasiliensis*, is the most intensively studied component aimed at a vaccine for PCM control. Previous reports have shown that mice immunized with the purified protein, DNA, or anti-idiotypic monoclonal antibody were partially protected against challenges by *P. brasiliensis* (28, 36, 37, 40). A 15-amino-acid peptide (QTLIAIHTLAIRY AN), designated P10, contains the gp43 immunodominant CD4$^+$ T-cell-specific epitope presented by major histocompatibility complex class II molecules from three different mouse haplotypes (37) and most human HLA-DR alleles (17, 18). Indeed, parenteral immunization with P10 in complete Freund adjuvant (CFA), or in the form of a truncated multiple-antigen peptide (MAP) complex, induced protective Th1 cellular immune responses in mice against intratracheal (i.t.) challenge with a virulent *P. brasiliensis* isolate (37, 38, 41).

The rational use of vaccines has been significantly improved after elucidation of innate immune mechanisms in mammalian cells. The recognition of distinct pathogen-associated molecular patterns by members of the Toll-like receptor (TLR) family initiates a signaling cascade mediated by adaptor proteins, including MyD88 and interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase, that culminates in the production of proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha and IL-12, and increased expression of cell surface molecules involved in epitope presentation by antigen-presenting cells (APC) (1, 19). Proper APC activation by TLR agonists represents a key step for an effective adaptive immune response induced by pathogens or vaccines and explains, at least in part, the marked adjuvant effects of several bacterial molecules, including lipopolysaccharides, lipoproteins, peptidoglycan fragments, and flagellins (2).

Flagellin, the structural subunit of bacterial flagellum, is a

* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology-ICB, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 São Paulo, SP 05008-000, Brazil. Phone: 55-11-30917338. Fax: 55-11-3091-7354. E-mail: lcsf@usp.br.
▽ Published ahead of print on 9 February 2009.

TABLE 1. Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s)	Source or reference
Strains		
Salmonella Dublin		
SL5928	*aroA his fliC*::Tn*10*	24
SL5930	SL5928 with pLS408; mobile	24
SLP10	SL5928 with pLSP10	This study
SLP10L	SL5928 with pLSP10L	This study
P. brasiliensis		
Pb18	Highly virulent human isolate of *P. brasiliensis*	35
Plasmids		
pLS408	pUC19 derivative carrying the *fliCd* gene from *S.* Müenchen with 48-bp deletion in the hypervariable region of the FliC gene *bla*	24
pLSP10	pLS408 derivative with a 45-bp insert encoding the P10 epitope	This study
pLSP10L	pLS408 derivative with a 57-bp insert encoding the P10 epitope with two flanking lysines	This study

highly conserved protein that induces TLR5-dependent inflammatory responses and exerts strong adjuvant effects on both antibody and cellular immune responses (12, 13, 30). Flagellin has been successfully used as a vaccine adjuvant to generate antigen-specific antibodies and T cells either when administered to mice as the native purified protein (4, 14, 20, 27) or as a hybrid protein genetically fused to the target antigen (10, 15, 16). Additionally, in contrast to other vaccine adjuvants, such as CFA, flagellin may exert strong adjuvant effects following administration through mucosal routes (14, 27).

In the present study, we have evaluated the adjuvant effects and protective efficacy of intranasal (i.n.) anti-PCM vaccine formulations based on *Salmonella enterica* serovar Dublin FliC flagellin and purified recombinant *P. brasiliensis* gp43 or the synthetic P10 peptide. In addition, recombinant chimeric flagellins genetically fused to P10 were also tested as potential anti-PCM vaccine antigens. The results demonstrate that *S. enterica* FliC flagellin modulates the murine immune system favoring either the generation of antibodies (gp43 plus FliC) or activation of cellular immune responses. In accordance with the administered vaccine formulation, mice challenged with *P. brasiliensis* were differentially protected against exacerbated fungal proliferation. The present results indicate that *Salmonella* FliC has an important role in the generation of mucus-delivered anti-*P. brasiliensis* peptide-based vaccine formulations. Furthermore, flagellin-based adjuvants may contribute to the understanding of immune mechanisms involved in PCM development.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions. The bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 1. The strain *Salmonella enterica* pv. Dublin SL5928 is a nonflagellated *aroA* attenuated vaccine strain (34). *Salmonella* pv. Dublin SL5930 is a SL5928 derivative transformed with the plasmid pLS408 encoding the gene *fliCd*, originally derived from *Salmonella enterica* serovar München, with a 48-bp deletion generated after removal of a EcoRV-EcoRV fragment from the central hypervariable domain leading to a single EcoRV site used for in-frame insertion of nucleotide sequences encoding heterologous epitopes. All *S.* Dublin and *Escherichia coli* strains were routinely cultivated at 37°C with shaking (200 rpm) in Luria-Bertani (LB) broth or on LB agar plates supplemented with ampicillin (100 μg/ml).

Fungal strain. The virulent *P. brasiliensis* Pb18 strain was maintained by weekly passages on solid Sabouraud medium at 36°C. Before experimental infection, cultures were grown in modified McVeigh-Morton medium at 36°C for 5 to 7 days (31). The fungal cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2) and counted in a hemocytometer. The upper part of cell suspensions that contained isolated or single budding cells was used in the infection experiments and for cell counting after decanting the clusters of yeast cells. The viability of fungal suspensions was determined by staining with trypan blue (Sigma, St. Louis, MO) and was always higher than 90%. The virulence of the Pb18 strain was checked in each experiment by infecting BALB/c mice i.t. and recovering the yeast cells from the infected organs.

Generation of hybrid flagellins genetically fused to P10. Chimeric *Salmonella* flagellins were generated after cloning the complementary oligonucleotides into the single EcoRV site of the pLS408-clonded FliC-encoding gene (24). Complementary 45-base oligonucleotides P10fw (5′-GAA ACC CTG ATT GCG ATT CAT ACC CTG GCG ATT CGC TAT GCG AAC-3′) and P10rv (5′-CTT TGG GAC TAA CGC TAA GTA TGG GAC CGC TAA GCG ATA CGC TTG-3′), encoding P10 (QTLIAIHTLAIRYAN), were melted at 65°C, annealed by slowly cooling at room temperature, and blunt end ligated with T4 DNA ligase to the EcoRV-cleaved pLS408. The same procedure was repeated with P10KKfw and P10KKrv oligonucleotides that, in addition to the sequence encoding the P10 peptide, carried on both 5′ and 3′ ends the sequence "AAA AAA," encoding two additional lysine residues flanking the heterologous epitope (KKQTLIAIHTLA IRYANKK) genetically fused to FliC flagellin, in order to improve the proteolytic processing by cathepsin B and enhance epitope processing and presentation by APC (42). The resulting plasmids (pLSP10, encoding the recombinant FliC genetically fused to P10, and pLSP10L, in which the P10 peptide is flanked by two lysine residues) were introduced by electroporation (using 0.2-cm electroporation cuvettes at 600 Ω, 25 μF, and 1.75 kV; Gene-Pulser [Bio-Rad, Hercules, CA]) into *E. coli* strain DH5α, and transformants were selected on LB plates containing ampicillin. Recombinant plasmids with the right inserts were screened by EcoRV digestion and sequenced with the BigDye Terminator DNA sequencing kit (PerkinElmer Applied Biosystems, Waltham, MA) using a 15-mer primer (5′-CCA GGT GCC TAC ACC CCG-3′) corresponding to a sequence located 50 bp downstream of the EcoRV insertion site in pLS408. The recombinant plasmids encoding *fliCd* genetically fused to P10 or the sequence flanked by two additional lysines were named pLSP10 and pLSP10L, respectively. Finally, the plasmids pLSP10 and pLSP10L were introduced into the flagellin-negative *S.* Dublin SL5928 strain by electroporation and the recombinant vaccine strains named SLP10 and SLP10L, respectively.

Purification of *Salmonella* flagellins. *Salmonella* flagellins, comprising FliC, FliCd-P10, and FliCd-P10L, were harvested from the respective *S.* Dublin SL5930, SLP10, and SLP10L strains cultivated in LB broth, according to a previously described procedure (4). Briefly, flagellins were obtained after centrifugation of cells, suspended in PBS (pH 7.4), and sheared in a bench mixer at maximal speed (a 1-min treatment repeated three times), followed by another centrifugation step to remove the bacterial cells. Broken flagellar fragments were precipitated with acetone, suspended in PBS, and finally, submitted to heat treatment (65°C for 30 min) to dissociate the flagellin monomers. The protein concentration was determined using the bicinchoninic acid assay (Pierce, Rockford, IL), and the purity of the protein preparations was monitored by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Removal of contaminating lipopolysaccharide was accomplished with Detoxi-Gel columns (Pierce, Rockford, IL) according to the manufacturer's instructions. Endotoxin levels, determined with the chromogenic *Limulus* amebocyte lysate assay (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD), were always below 3.0 endotoxin units/μg of protein.

Purification of gp43 antigen. *P. brasiliensis* Pb18 was cultivated in yeast Sabouraud liquid medium for 7 days at 36°C with shaking. The culture was inactivated by adding 0.2 g of thimerosal (Merthiolate)/liter filtered through filter paper, concentrated in a vacuum at 40°C, and dialyzed against distilled water. Purification of gp43 was obtained by affinity chromatography on Affi-Gel (Bio-Rad, Hercules, CA) bound to anti-gp43 monoclonal antibody as previously described (29). Elution was carried out with 50 mM citrate buffer, pH 2.8. The eluate was concentrated in Amicon 10K cells, and the antigen preparation was monitored by SDS-PAGE revealed with silver staining. The protein content was determined by the Bradford method (3).

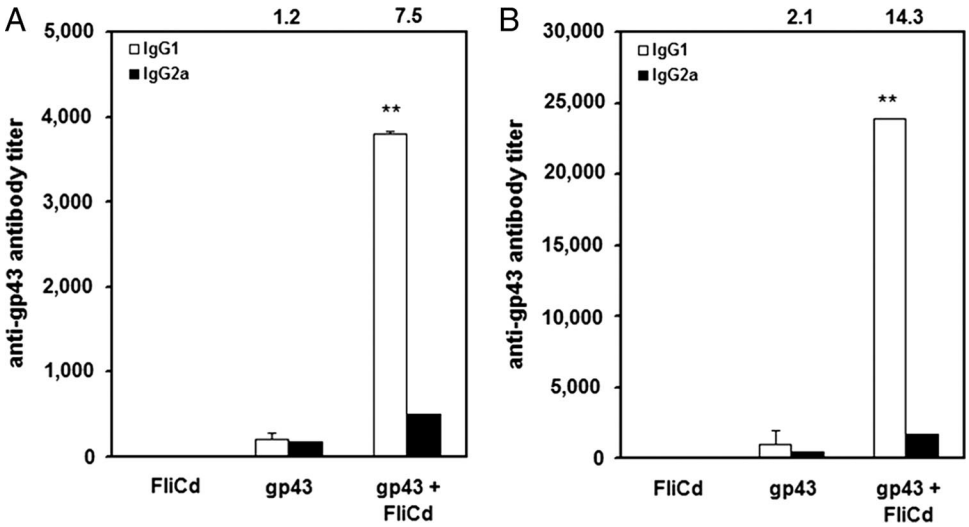


FIG. 1. Characterization of the specific serum IgG subclass response elicited in mice i.n. immunized with gp43 or gp43 admixed with FliC. (A) Anti-gp43-specific IgG subclass detected 1 week after the last immunization dose. (B) Anti-gp43-specific IgG subclass detected in vaccinated mice 2 months after i.t. challenge with the Pb18 strain. gp43, mice immunized with 3 doses of purified gp43; gp43 + FliCd, mice immunized with purified gp43 admixed with FliC. For the other groups (FliCd, FliCd-P10, FliCd-P10L, and P10 + FliCd), a gp43-specific antibody response was not detected. Values are means of endpoint titers plus standard deviations for serum pools ($n = 8$) prepared from each mouse group. Data are representative of two independent experiments with similar results. The IgG1/IgG2a ratio of each immunization group is indicated at the top of the figure. Asterisks indicate a statistically significant difference observed between mice immunized with gp43 and mice immunized with gp43 admixed with FliC ($P \leq 0.01$).

SDS-PAGE. SDS-PAGE was performed following standard procedures using a Mini-Protean II vertical electrophoresis unit (Bio-Rad, Hercules, CA). Proteins sorted in 12% polyacrylamide gels were stained with Coomassie blue.

Immunization regimens. Isogenic pathogen-free 8- to 12-week-old male BALB/c (H-2^d) mice were supplied by the Isogenic Mouse Breeding Facility of the Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences (ICB), University of São Paulo (USP). Animal handling was carried out in accordance with the Brazilian code for use of laboratory animals and was approved by the Ethics Committee of ICB, USP. Groups of 8 to 10 animals were immunized via the i.n. route with 15 μg of each fusion protein (FliCd-P10 or FliCd-P10L) or with a mixture of 20 μg P10 peptide or 25 μg gp43 protein with 5 μg FliC flagellin. Control groups were immunized with sterile PBS, 25 μg of gp43, 5 μg FliC flagellin, or 20 μg of P10 peptide in Freund adjuvant 1:1 (vol/vol). The formulations were instilled into the nostrils (5 μl/nostril) with a micropipette on days 0, 21, and 28. The control group immunized with P10 in Freund adjuvant received 1 dose (20 μg of the peptide plus CFA in a total volume of 50 μl) via the subcutaneous route (rear footpads) and 3 doses (20 μg of the peptide in incomplete Freund adjuvant; a total volume of 200 μl) administered intraperitoneally at 1-week intervals. Immune responses were evaluated 7 days after immunization and 60 days after fungal challenge.

Challenge with *P. brasiliensis* yeast cells. Eighty days after the last immunization, mice were inoculated i.t. with 3×10^5 yeast cells/animal of virulent *P. brasiliensis* Pb18 grown on Sabouraud agar and suspended in sterile saline (0.85% NaCl). A maximum of 50 μl was inoculated per mouse. Briefly, mice were anesthetized intraperitoneally with 200 μl of a solution containing 80 mg of ketamine/kg of body weight and 10 mg/kg of xylazine (both from União Química Farmacêutica, Brazil). After approximately 10 min, the necks were extended and the tracheas exposed at the level of the thyroid. For the i.t. inoculation, a 26-gauge needle was used and the incisions were sutured, right afterwards, with a 5 to 0 silk thread.

Fungal burden in organs of infected mice. Mice were sacrificed 60 days after i.t. infection, and the fungal burden was measured by CFU. Sections of the lungs, livers, and spleens were removed, weighed, and homogenized using a tissue grinder in 10 ml of sterile PBS. The corresponding pellets were resuspended and homogenized each in 1 ml of PBS. A 100-μl sample of this suspension was plated on solid brain heart infusion medium supplemented with 4% fetal calf serum (Gibco, NY), 5% spent *P. brasiliensis* (strain 192) culture supernatant, streptomycin/penicillin (10 IU/ml) (Cultilab, Brazil), and cycloheximide (500 mg/ml) (Sigma, St. Louis, MO). Petri dishes were incubated at 36°C for at least 20 days, and colonies were counted (1 colony = 1 CFU) (35).

Lung histopathology. Following immunization with different vaccine formulations, BALB/c mice were i.t. infected and sacrificed after 2 months. The lungs were excised, fixed in 10% buffered formalin, and embedded in paraffin for sectioning. The sections were stained with hematoxylin-eosin and examined microscopically (Optiphot-2; Nikon, Tokyo, Japan).

Cytokine determination by enzyme-linked immunosorbent assay. Cytokine analysis was performed 7 days after the immunizations and 2 months after infection of the animals. Lung sections (right and left alternating) of mice were homogenized in 2 ml of PBS in the presence of protease inhibitors (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). The homogenates were centrifuged, and the supernatants were frozen at −80°C until tested. The supernatants were assayed for IL-4, IL-10, IL-12, and gamma interferon (IFN-γ) using enzyme-linked immunosorbent assay kits (BD PharMingen, San Diego, CA). The detection limits of such assays were as follows: 7.8 pg/ml for IL-4, 31.25 pg/ml for IL-10 and IFN-γ, and 62.5 pg/ml for IL-12p40, as indicated by the manufacturer.

Statistical analysis. Data were analyzed by one-way analysis of variance and Student's t test followed by Tukey's honestly significant difference test and Dunnett's multiple comparison tests to compare the differences between the mean values of the immunization groups studied.

RESULTS

Mice immunized with purified gp43 admixed with *Salmonella* FliC flagellin develop specific antibody responses. Male BALB/c mice received three i.n. doses of purified gp43 alone or admixed with purified FliC, and the serum gp43-specific immunoglobulin G (IgG) responses were measured 7 days after the last immunization and 60 days after the i.t. challenge with *P. brasiliensis* strain Pb18. Enhanced gp43-specific IgG1 antibodies were detected in noninfected mice immunized with the FliC-containing vaccine formulation (IgG1 titer, 3,804 ± 28.83) but not in animals immunized with purified gp43 (IgG1 titer, 207 ± 75.12) (Fig. 1A). A further 6.2-fold increase in the anti-gp43 serum IgG1 was detected in vaccinated mice following challenge with Pb18 (average IgG1 titer, 23,924 ± 21.00) in mice immunized with the FliC-containing vaccine formulation

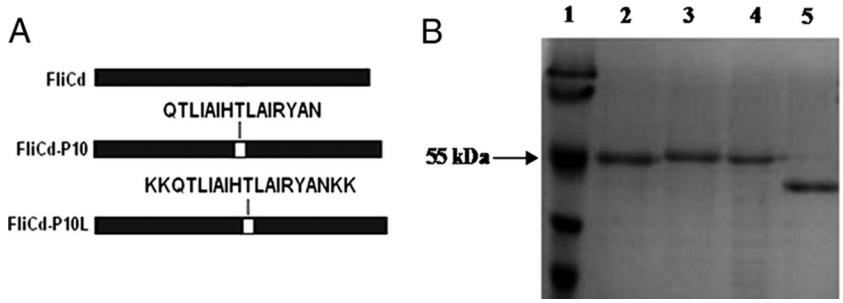


FIG. 2. Generation of recombinant hybrid flagellins genetically fused to the CD4$^+$ T-cell-specific gp43-derived P10 epitope. (A) Schematic representation of the recombinant flagellins after P10 in-frame insertion at FliC central hypervariable domain. The two recombinant flagellins carried the P10 peptide (FliCd-P10) or the P10 peptide with lysine residues on each side of the fusion site (FliCd-P10L). (B) Coomassie blue-stained 12% polyacrylamide gel loaded with flagellins extracted from different *Salmonella* strains. Lane 1, molecular mass markers (Fermentas); lane 2, FliCd flagellin extracted from *S.* Dublin strain SL5930 (with no insert); lane 3, FliCd-P10 flagellin extracted from *S.* Dublin strain SLP10; lane 4, FliCd-P10L flagellin extracted from *S.* Dublin strain SLP10L; lane 5, purified gp43. Each well was loaded with approximately 2 μg of purified flagellins or gp43.

(Fig. 1B). Determination of the specific IgG subclasses elicited in mice immunized with gp43/FliC vaccine formulation revealed a biased type 2 response with IgG1/IgGa ratios of 7.5 and 14.3 before and after the fungus challenge, respectively (Fig. 1). These results indicate that *Salmonella* FliC flagellin acted as a strong antibody-inducing adjuvant when admixed with purified *P. brasiliensis* gp43 following mucosal administration in BALB/c mice.

Generation of vaccine formulations based on P10 genetically fused or admixed with *Salmonella* FliC. Additional anti-*P. brasiliensis* vaccine formulations were tested and employed the P10 peptide in combination with FliC. The first approach relied on the generation of hybrid flagellins in which the P10 minigene was wedged in frame at the central hypervariable domain of FliC, a permissive insertion site that did not affect both the inflammatory and adjuvant properties of *Salmonella* flagellin (Fig. 2A). The resulting recombinant *S.* Dublin SLP10 (encoding FliCd-P10) and SLP10L (encoding FliCd-P10L) strains were nonmotile in semisolid agar plates but expressed abundant extracellular flagella composed by hybrid flagellins with slightly altered molecular weights, as demonstrated by SDS-PAGE of purified flagella (Fig. 2B). After purification, the flagellin preparations were >95% pure and endotoxin levels were below 3.0 endotoxin units/μg of protein. Another P10-based vaccine formulation involved admixing of purified native FliC (5 μg) with the synthetic P10 peptide (20 μg).

Cytokine expression patterns in mice immunized with different vaccine formulations containing *Salmonella* FliC flagellin. The cytokine (IL-4, IL-10, IL-12, and IFN-γ) expression pattern in the lung tissue of mice immunized with the different vaccine formulations was determined 7 days after the last immunization dose and 60 days following the i.t. challenge with *P. brasiliensis* Pb18 yeast forms. As shown in Table 2, the concentrations of IL-4 and IL-10 were low in lung extracts from all immunized groups except in animals immunized with purified gp43 admixed with FliC, in which IL-4 and mainly IL-10 appeared in higher concentrations than in nonimmunized mice or mice vaccinated with FliC only. This picture changed considerably when the same cytokines were measured in vaccinated mice 2 months after the challenge with the Pb18 strain. The IL-4 and IL-10 concentrations in mice immunized with gp43 were approximately 30% lower than the values detected in nonimmunized animals, but the addition of FliC enhanced production of cytokines to levels similar to those found in the nonimmunized control group. Mice immunized with the recombinant hybrid P10/flagellins had IL-4 and IL-10 levels similar to animals immunized only with gp43 or FliC. On the other hand, mice immunized with FliC admixed with the synthetic

TABLE 2. Cytokine levels detected in lungs of mice immunized with different vaccine formulations[a]

Vaccine group	Level (ng/ml) (mean ± SD) of cytokine:							
	IL-4		IL-10		IL-12		IFN-γ	
	BC	AC	BC	AC	BC	AC	BC	AC
PBS	0.08 ± 0.03	6.22 ± 0.41	0.07 ± 0.07	14.42 ± 1.95	0.25 ± 0.44	25.90 ± 3.86	0.05 ± 0.03	4.37 ± 0.53
FliCd	1.50 ± 0.24	2.93 ± 0.64	2.76 ± 0.29	7.52 ± 1.97	5.33 ± 1.34	22.00 ± 1.56	1.23 ± 0.07	9.96 ± 1.08
gp43	0.20 ± 0.01[b]	4.77 ± 0.55[b]	0.18 ± 0.10[b]	10.25 ± 2.09	3.07 ± 0.46[b]	30.07 ± 1.44[b]	0.66 ± 0.09[b]	12.62 ± 0.44[b]
gp43 + FliCd	3.01 ± 0.82[b]	6.05 ± 1.16[b]	4.10 ± 0.39[c]	14.40 ± 4.90[b]	7.46 ± 0.46[b]	36.24 ± 2.05[c]	2.25 ± 0.49[b]	20.61 ± 4.13[c]
FliCd-P10	0.82 ± 0.56	3.21 ± 0.83	2.39 ± 0.15	9.48 ± 2.30	4.38 ± 0.97	30.67 ± 3.10[b]	1.26 ± 0.25	4.89 ± 1.05
FliCd-P10L	0.60 ± 0.30[b]	3.16 ± 0.22	1.00 ± 0.70[b]	8.95 ± 0.93	3.65 ± 0.83	22.76 ± 2.26	0.44 ± 0.06[b]	7.16 ± 1.40[b]
P10 + FliCd	1.50 ± 0.49	2.80 ± 0.06	1.47 ± 0.88[b]	1.46 ± 0.66[b]	9.40 ± 0.86[c]	36.63 ± 2.37[c]	2.35 ± 0.19[b]	18.10 ± 0.25[b]

[a] Immunization groups (5 to 8 animals/group) are as described in the legend to Fig. 2. BC, before challenge; AC, after challenge.
[b] $P < 0.05$; statistically significant difference relative to that of mice immunized only with the FliCd flagellin.
[c] $P < 0.01$; statistically significant difference relative to that of mice immunized only with the FliCd flagellin.

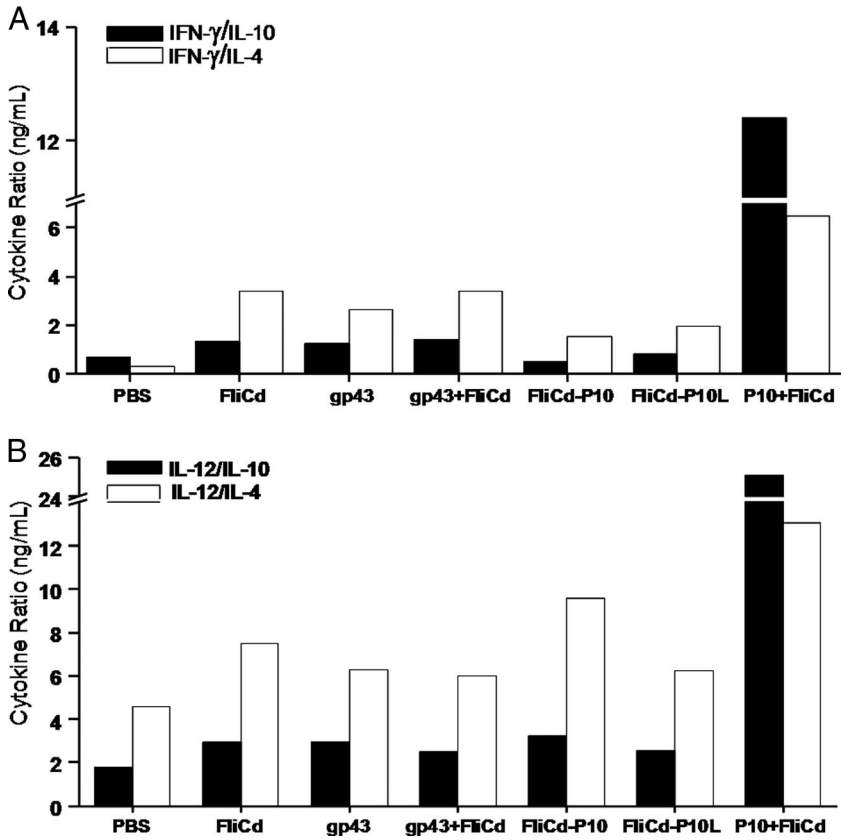


FIG. 3. Cytokine relative ratios measured in lungs of mice after challenge with the Pb18 strain. All cytokines were measured in whole extracts of lung cells. Immunization groups and specific cytokine values used in the cytokine ratio determination were as depicted in Table 2.

P10 peptide had IL-4 and IL-10 values equal to those in nonchallenged vaccinated animals, which were statistically different from the values in animals immunized only with FliC.

Measurements of IL-12 and IFN-γ in vaccinated mice showed that all tested vaccines led to enhanced cytokine expression in lung cells, but statistically significant differences with regard to nonimmunized animals were observed only in animals immunized with gp43 and P10 admixed with FliC (Table 2). Interestingly, there was no significant enhancement in IL-12 and IFN-γ levels detected in mice immunized with the recombinant flagellins compared to mice immunized only with FliC, both before and after i.t. challenge with Pb18. However, mice immunized with the P10 and FliC mixture, as well as those immunized with gp43 plus FliC, produced enhanced IL-12 and IFN-γ levels similar to those detected in mice immunized with gp43 admixed with FliC. On the other hand, the IL-10 levels of P10 plus FliC-vaccinated mice remained lower than those detected in mice immunized with FliC, particularly after challenge with Pb18. Collectively, these data suggest that the vaccine formulation based on P10 admixed with FliC induced a predominant Th1 immune response compared to mice immunized with the other tested vaccine formulations. Determination of the IFN-γ/IL-4 (or IFN-γ/IL-10) and IL-12/IL-4 (or IL-12/IL-10) ratios clearly demonstrated that mice immunized with P10 admixed with FliC developed a more pronounced Th1-biased immune response compared to animals immunized with the other vaccine formulations (Fig. 3).

Growth of *P. brasiliensis* in lung tissues of mice vaccinated with the different vaccine formulations. The protective effects of the vaccine formulations were determined 2 months after the i.t. challenge with the virulent Pb18 strain. CFU counts were determined in homogenized lung tissue from vaccinated animals as well as from nonimmunized mice and those inoculated only with purified FliC (Fig. 4). In mice i.n. immunized with gp43 only, there was a significant reduction in the number of fungal colonies compared to the nonimmunized (PBS) or the FliC-immunized groups, in agreement with previously described results based on parenteral immunizations (37). Mice immunized with gp43 admixed with FliC, however, showed enhanced fungal proliferation in the lung tissues compared to the nonimmunized (PBS) or the FliC-immunized groups. Mice immunized with the hybrid flagellins (FliCd-P10 or FliCd-P10L) showed a reduction in the number of viable yeast cells similar to that observed in mice immunized with gp43 without adjuvant. Furthermore, mice immunized with the vaccine formulation prepared with the synthetic P10 peptide admixed with FliC had a drastically reduced number of viable fungal cells recovered from their lung tissues (<100 CFU/g lung tissue) 2 months after challenge with the Pb18 strain. In contrast to mice immunized with gp43 or gp43 plus FliC, no viable yeast cells were recovered from spleen and liver homogenates from mice vaccinated with P10 admixed with FliC or the hybrid flagellins (data not shown).

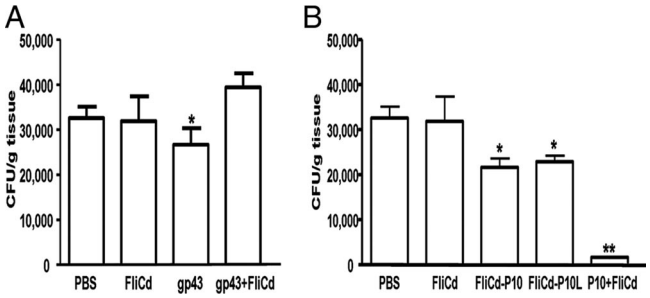


FIG. 4. Detection of viable fungal cells in lung tissues of vaccinated mice after i.t. challenge with *P. brasiliensis* Pb18. (A) Detection of viable fungi in mice i.n. immunized with purified gp43 or gp43 admixed with FliC. Immunization groups are as described in the legend to Fig. 2. (B) Detection of viable fungal cells in mice i.n. immunized with P10 epitope genetically fused with flagellin (FliCd-P10 or FliCd-P10L) or synthetic P10 peptide admixed with FliC flagellin. PBS, mice immunized only with PBS; FliCd, mice immunized only with FliC; FliCd-P10 and FliCd-P10L, mice immunized with purified recombinant FliCd-P10 and FliCd-P10L, respectively; P10+FliCd, mice immunized with P10 admixed with FliCd. All mice groups were i.t. challenged with the Pb18 strain and sacrificed 2 months later for determination of CFU in homogenized lung tissue. The same experiments were repeated three times. Each bar represents the medium number plus standard deviation in organs collected from 8 to 10 animals in each group. Asterisks indicate statistically significant differences between results detected in mice immunized with gp43 and P10 and those in mice immunized only with FliC (*, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$).

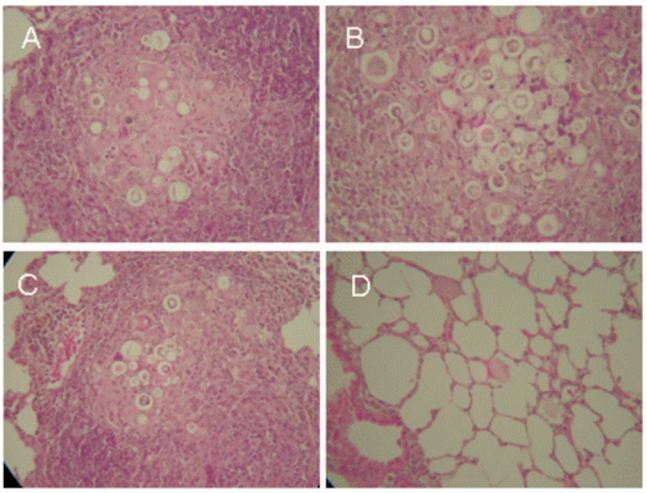


FIG. 5. Representative histopathology of lung lesions caused by *P. brasiliensis* strain Pb18 in mice immunized with different vaccine formulations. Tissue samples were collected 2 months after i.t. challenge with strain Pb18. (A) Lung section from PBS-immunized mouse with granuloma containing multiple viable fungal cells. (B) Lung section from a mouse immunized with gp43 admixed with FliC. Observe the extensive granulomatous lesions with intense cellular infiltration and large number of multiplying fungal cells. (C) Lung section from mouse immunized with the hybrid FliCd-P10L. (D) Lung section from mouse immunized with P10 admixed with FliC showing preserved alveolar structure and absence of granulomatous lesions and fungal cells. All sections were amplified 40-fold and stained with hematoxylin-eosin.

Histological analysis of lung tissue damage in immunized mice challenged with *P. brasiliensis*. Histopathological analyses of lung tissue samples collected from mice submitted to different vaccine formulations showed that mice immunized with gp43 admixed with FliC had extensive tissue destruction, with abundant cellular infiltration (Fig. 5B). Exudative epithelioid granulomas containing giant cells with multiplying fungal cells were also observed in this vaccination group to a higher extent than in nonimmunized animals (Fig. 5A). Mice immunized with the hybrid recombinant FliCd-P10 and FliCd-P10L flagellins showed lower numbers of exudative lesions than those detected in animals immunized with FliC only or nonimmunized animals (Fig. 5C). The number of visible, detectable, and viable fungi was also lower than in the control groups. In contrast, lung tissues of mice immunized with P10 admixed with flagellin were virtually devoid of granulomas and viable fungal cells. The lung tissues of mice immunized with P10 plus FliC showed preserved alveolar organization with no indication of phagocytic cell infiltration (Fig. 5D).

DISCUSSION

In the present study, mucus-delivered vaccine formulations based on the *Salmonella* FliC flagellin revealed contrasting, but rather interesting, results regarding induction of specific immune response and prophylactic protection against a virulent *P. brasiliensis* strain in the murine model. While i.n. administration of purified gp43 admixed with FliC induced a Th-2-biased immune response, leading to exacerbated fungal multiplication and tissue damage, vaccine formulations based on hybrid flagellins genetically fused with the gp43-derived P10 sequence, and mainly purified FliC admixed with synthetic P10 peptide, resulted in a Th1 predominant immune response and enhanced protection to the fungal challenge in vaccinated mice. The present evidence represents the first attempt to develop experimental anti-PCM mucosal vaccines and extends the knowledge about *Salmonella* flagellin adjuvant effects associated with different antigens.

The mucus-delivered vaccines have several advantages over conventional parenteral vaccines. For example, mucosal vaccines are easier to administer, lack iatrogenic infection risks, and more importantly, induce broader immunity, including activation of both systemic and local immune responses, a feature that may be particularly relevant for airborne infections. Therefore, the incorporation of *Salmonella* flagellin, a potent adjuvant known to act both parenterally and at mucosal sites, to P10-based vaccine formulations represented an alternative to the Freund adjuvant previously used in other anti-PCM vaccines. Indeed, it opens a renewed perspective for a future clinical use.

The epitope-based vaccine concept was designed as a strategy to preserve antigen immunogenicity but avoid potential undesirable effects, such as activation of suppressive immune responses or induction of self-reacting antibodies (21). The low immunogenicity of synthetic peptides, which represents a major drawback in the development of effective peptide-based vaccines, stimulated parallel experimental procedures, such as the use of potent adjuvants, synthesis of tandem repeats or MAPs, and genetic fusion with carrier proteins (25). In the present study, we have shown that the combination of the synthetic P10 peptide and the *Salmonella* FliC flagellin elicited strong activation of $CD4^+$ T-cell-dependent immune responses leading to the efficient control of fungal infection in vaccinated mice. The best results were achieved with the pep-

tide admixed with the adjuvant, thus avoiding complex and expensive chemical synthetic procedures or generation and purification of hybrid peptides by genetic engineering methods. The rather promiscuous binding of P10 to several major histocompatibility complex class II molecules, both from mice and humans (17, 37), in combination with the strong mucosal adjuvant effects of *Salmonella* flagellins resulted in enhanced vaccine efficacy, leading to more efficient control of fungus multiplication.

The genetic fusion of ovalbumin or the influenza virus M2 protein to *Salmonella* flagellins was required to generate antigen-specific B- and T-cell-dependent responses (15, 16). In our hands, coadministration of flagellin and the P10 peptide resulted in a higher Th1-biased immune response than that in mice immunized with hybrid flagellin genetically fused with P10. Linking antigens to flagellin would supply in a single molecule the signals required for activation and maturation of APC, but the present results based on a mucus-delivered formulation as well as other parenterally delivered vaccines (4, 23) clearly show that genetic fusion of flagellin to the target antigen does not represent a requirement for proper stimulation of the immune system by flagellin-containing vaccine formulations.

Quantification of IFN-γ and IL-12 indicated that mice immunized with P10 admixed with FliC developed a more pronounced Th1 immune response than mice immunized with the recombinant hybrid flagellins (FliCd-P10 and FliCd-P10L). Additionally, determination of the IFN-γ/IL-4 and IFN-γ/IL-10 ratios (as well as the IL-12/IL-4 and IL-12/IL-10 ratios) showed that mice immunized with FliC and P10 elicited a predominant Th1 immune response to other immunization groups, including mice immunized with gp43 and FliC and those immunized with the recombinant hybrid P10-containing flagellins. Indeed, induction of a Th1-biased immune response positively correlated with asymptomatic and mild forms of PCM in humans as well as resistance to *P. brasiliensis* infection in mice (9, 22, 26, 32). Additionally, the lack of anti-gp43 antibodies in animals immunized with the P10/FliC formulation further showed that immunization with P10 peptide avoids other gp43 sequences involved in nonprotective anti-*P. brasiliensis* immune responses. The possibility to add another gp43-derived peptide, which reacts with a protective monoclonal antibody (7), may further enhance the efficacy of the vaccine formulation by means of a proper Th1 response in combination with a protective antibody response.

Innate immunity has a pivotal role on the control of *P. brasiliensis* replication, as well as other microbial pathogens, in different mammalian hosts (8). TLR ligands directly interact with macrophages and dendritic cells, leading to inflammatory responses required for the direct elimination of the pathogen and generation of protective adaptive responses. In this study, we demonstrated that incorporation of *Salmonella* FliC, a TLR-5 ligand, may trigger anti-PCM immune responses ranging from complete prophylactic protection to exacerbated parasite multiplication according to the nature of the antigen tested, thus offering new tools for the understanding of the immunological mechanisms leading to resistance or sensitivity to *P. brasiliensis*. In addition, the evidence that the immunogenicity of epitope-based vaccines, when associated with *Salmonella* FliC, may elicit a protective immune response in vaccinated mice raises new perspectives for the development of improved vaccine formulations and warrants further studies aimed at the prophylactic and therapeutic control of PCM.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from Fapesp (São Paulo State Foundation for Research Support) and a Brazilian federal government grant for the Millennium Institute for Vaccine Development and Technology (CNPq).

We acknowledge the valuable technical assistance of L. C. Silva.

REFERENCES

1. **Akira, S., and K. Takeda.** 2004. Toll-like receptor signaling. Nat. Rev. Immunol. **4:**499–511.
2. **Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi.** 2006. Pathogen recognition and innate immunity. Cell **124:**783–801.
3. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72:**248–254.
4. **Braga, C. J. M., L. M. Massis, B. C. G. Alencar, M. M. Rodrigues, M. E. Sbrogio-Almeida, and L. C. S. Ferreira.** 2008. Cytotoxic T cell adjuvant effects of three *Salmonella enterica* flagellins. Braz. J. Microbiol. **39:**44–49.
5. **Borges-Walmsley, M. I., D. Chen, X. Shu, and A. R. Walmsley.** 2002. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. Trends Microbiol. **10:**80–87.
6. **Brummer, E., E. Castaneda, and A. Restrepo.** 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. Clin. Microbiol. Rev. **6:**89–117.
7. **Buissa-Filho, R., R. Puccia, A. F. Marques, F. A. Pinto, J. E. Muñoz, J. D. Nosanchuk, L. R. Travassos, and C. P. Taborda.** 2008. The monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* mediates immune protection in infected BALB/c mice challenged intratracheally with the fungus. Infect. Immun. **76:**3321–3328.
8. **Calich, V. L. G., T. A. da Costa, M. Felonato, C. Arruda, S. Bernardino, F. V. Loures, L. R. R. Ribeiro, R. C. Valente-Ferreira, and A. Pina.** 2008. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Mycopathologia **165:**223–236.
9. **Cano, L. E., S. Y. S. Kashino, C. Arruda, D. Andre, C. F. Xidieh, L. M. Singer-Vermes, C. A. C. Vaz, E. Burger, and V. L. G. Calich.** 1998. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. Infect. Immun. **66:**800–806.
10. **Cuadros, C., F. J. Lopez-Hernandez, A. L. Dominguez, M. McClelland, and J. Lustgarten.** 2004. Flagellin fusion proteins as adjuvants or vaccines induce specific immune responses. Infect. Immun. **72:**2810–2816.
11. **do Nascimento Martins, E. M., B. S. Reis, V. C. Fernandes, M. M. S. Costa, A. M. Góes, and A. S. R. de Andrade.** 2007. Immunization with radioattenuated yeast cells of *Paracoccidioides* brasiliensis induces a long lasting protection in BALB/c mice. Vaccine **25:**7893–7899.
12. **Gewirtz, A. T., T. A. Navas, S. Lyons, P. J. Godowisk, and J. L. Madara.** 2001. Bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflamatory gene expression. J. Immunol. **167:**1882–1885.
13. **Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, and A. Aderem.** 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature **410:**1099–1103.
14. **Honko, A., N. Sriranganathan, C. J. Lees, and S. B. Mizel.** 2006. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. Infect. Immun. **74:**1113–1120.
15. **Huleatt, J. W., A. R. Jacobs, J. Tang, P. Desai, E. B. Kopp, Y. Huang, L. Song, V. Nakaar, and T. J. Powell.** 2007. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. Vaccine **25:**763–775.
16. **Huleatt, J. W., V. Nakaar, P. Desai, Y. Huang, D. Hewitt, A. Jacobs, J. Tang, W. McDonald, L. Song, R. K. Evans, S. Umlauf, L. Tussey, and T. J. Powell.** 2008. Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. Vaccine **26:**201–214.
17. **Iwai, L. K., M. Yoshida, J. Sidney, M. A. Shikanai-Yasuda, A. C. Goldberg, M. A. Juliano, J. Hammer, L. Juliano, A. Sette, J. Kalil, L. R. Travassos, and E. Cunha-Neto.** 2003. In silico prediction of peptides binding to multiple HLA-DR molecules accurately identifies immunodominant epitopes from gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* frequently recognized in primary peripheral blood mononuclear cell responses from sensitized individuals. Mol. Med. **9:**209–219.
18. **Iwai, L. K., M. Yoshida, A. Sadahiro, R. W. da Silva, M. L. Marin, A. C. Goldberg, M. A. Juliano, L. Juliano, M. A. Shikanai-Yasuda, J. Kalil, E. Cunha-Neto, and L. R. Travassos.** 2007. T cell recognition of *Paracoccidioides brasiliensis* gp43-derived peptides in patients with paracoccidioidomycosis and healthy individuals. Clin. Vaccine Immunol. **14:**474–476.
19. **Iwasaki, A., and R. Medzhitov.** 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Nat. Immunol. **5:**987–995.

20. **Lee, S. E., S. Y. Kim, B. C. Jeong, Y. R. Kim, S. J. Bae, O. S. Ahn, J. J. Lee, H. C. Song, J. M. Kim, H. E. Choy, S. S. Chung, M. N. Kweon, and J. H. Rhee.** 2006. A bacterial flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity. Infect. Immun. **74:**694–702.
21. **Liu, Z., Y. Xian, and Y. Chen.** 2003. Epitope-vaccine strategy against HIV-1: today and tomorrow. Immunobiology **208:**423–428.
22. **Livonesi, M. C., J. T. Souto, A. P. Campanelli, C. M. L. Maffei, R. Martinez, M. A. Rossi, and J. S. Da Silva.** 2008. Deficiency of IL-12p40 subunit determines severe paracoccidioidomycosis in mice. Med. Mycol. **46:**637–646.
23. **McSorley, S. J., B. D. Ehst, Y. Yu, and A. T. Gewirtz.** 2002. Bacterial flagellin is an effective adjuvant for $CD4^+$ T cells in vivo. J. Immunol. **169:**3914–3919.
24. **Newton, S. M., C. O. Jacob, and B. A. Stocker.** 1989. Immune response to cholera toxin epitope inserted in *Salmonella* flagellin. Science **244:**70–72.
25. **Olive, C. T. T., and D. Jackson.** 2001. Technological advances in antigen delivery and synthetic peptide vaccine development strategies. Mini-Rev. Med. Chem. **1:**429–438.
26. **Pina, A., R. C. Valente-Ferreira, E. E. W. Molinari-Madlum, C. A. C. Vaz, A. C. Keller, and V. L. G. Calich.** 2004. Absence of interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. Infect. Immun. **72:**2369–2378.
27. **Pino, O., M. Martin, and S. M. Michalek.** 2005. Cellular mechanisms of the adjuvant activity of the flagellin component FljB of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to potentiate mucosal and systemic responses. Infect. Immun. **73:**6763–6770.
28. **Pinto, A. R., R. Puccia, S. N. Diniz, M. F. Franco, and L. R. Travassos.** 2000. DNA based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. Vaccine **18:**3050–3058.
29. **Puccia, R., L. R. Travassos, E. G. Rodrigues, A. K. Carmona, M. C. Oliveira, and L. Juliano.** 1994. Purification of the specific exocellular antigen gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunological and proteolytic activities, p. 507–515. *In* B. Maresca and G. S. Kobayashi (ed.), Molecular biology of pathogenic fungi: a laboratory manual. Telos Press, New York, NY.
30. **Ramos, H. C., M. Rumbo, and J. C. Sirard.** 2004. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. Trends Microbiol. **12:**509–517.
31. **Restrepo, A., and M. D. Arango.** 1980. In vitro susceptibility testing of *Paracoccidioides brasiliensis* to sulfonamides. Antimicrob. Agents Chemother. **18:**190–194.
32. **Romano, C. C., M. J. S. Mendes-Giannini, A. J. S. Duarte, and G. Benard.** 2002. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. Cytokine **18:**149–157.
33. **San-Blas, G., A. Restrepo, K. Clemons, D. A. Stevens, F. San-Blas, R. Puccia, et al.** 1992. Paracoccidioidomycosis. J. Med. Vet. Mycol. **30:**59–71.
34. **Sbrogio-Almeida, M. E., T. Mosca, L. M. Massis, I. A. Abrahamsohn, and L. C. Ferreira.** 2004. Host and bacterial factors affecting induction of immune responses to flagellin expressed by attenuated *Salmonella* vaccine strains. Infect. Immun. **72:**2546–2555.
35. **Singer-Vermes, L. M., M. C. Ciavaglia, S. S. Kashino, E. Burger, and V. L. Calich.** 1992. The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. J. Med. Vet. Mycol. **30:**261–264.
36. **Souza, E. B., J. D. Lopes, and S. R. Almeida.** 2004. B and T cell responses elicited by monoclonal anti-idiotypic antibody (Ab2b) mimicking gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis*. Clin. Exp. Immunol. **137:**123–128.
37. **Taborda, C. P., M. A. Juliano, R. Puccia, M. Franco, and L. R. Travassos.** 1998. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. Infect. Immun. **66:**786–793.
38. **Taborda, C. P., C. R. Nakaie, E. M. Cilli, E. G. Rodrigues, L. S. Silva, M. F. Franco, and L. R. Travassos.** 2004. Synthesis and immunological activity of a branched peptide carrying the T-cell epitope of gp43, the major exocellular antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. Scand. J. Immunol. **59:**58–65.
39. **Travassos, L. R., G. Goldman, C. P. Taborda, and R. Puccia.** 2007. Insights in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenicity, p. 241–265. *In* K. Kavanagh (ed.), New insights in medical mycology. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
40. **Travassos, L. R., C. P. Taborda, and A. L. Colombo.** 2008. Treatment options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. Expert Rev. Anti. Infect. Ther. **6:**251–262.
41. **Travassos, L. R., E. G. Rodrigues, L. K. Iwai, and C. P. Taborda.** 2008. Attempts at a peptide vaccine against paracoccidioidomycosis, adjuvant to chemotherapy. Mycopathologia **165:**341–352.
42. **Verma, N. K., H. K. Ziegler, B. A. D. Stocker, and G. K. Schoolnik.** 1995. Induction of a cellular immune response to a defined T-cell epitope as an insert in the flagellin of a live vaccine strain of *Salmonella*. Vaccine **13:**235–244.

Editor: A. Casadevall

ANEXO C - Artigo Publicado

Vaccine
2010, p. 1373–1382 Vol. 28
doi:10.1016/j.vaccine.2009.11.003

CD8$^+$ T cell adjuvant effects of *Salmonella* FliC*d* flagellin in live vaccine vectors or as purified protein

Catarina J.M. Braga[a], Liliana M. Massis[a], Maria E. Sbrogio-Almeida[c], Bruna C.G. Alencar[b], Daniel Y. Bargieri[b], Silvia B. Boscardin[d], Maurício M. Rodrigues[b], Luís C.S. Ferreira[a,*]

Vaccine 28 (2010) 1373–1382

Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

CD8⁺ T cell adjuvant effects of *Salmonella* FliC*d* flagellin in live vaccine vectors or as purified protein

Catarina J.M. Braga[a], Liliana M. Massis[a], Maria E. Sbrogio-Almeida[c], Bruna C.G. Alencar[b], Daniel Y. Bargieri[b], Silvia B. Boscardin[d], Maurício M. Rodrigues[b], Luís C.S. Ferreira[a,*]

[a] Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, São Paulo, SP 05008-000, Brazil
[b] Centro Interdisciplinar de Terapia Gênica (CINTERGEN), Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil
[c] Division of Technological Development and Production, Butantan Institute, São Paulo, Brazil
[d] Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 March 2009
Received in revised form 1 November 2009
Accepted 3 November 2009
Available online 21 November 2009

Keywords:
Flagellin
Adjuvants
T cell vaccines

ABSTRACT

Salmonella flagellin, the flagellum structural subunit, has received particular interest as a vaccine adjuvant conferring enhanced immunogenity to soluble proteins or peptides, both for activation of antibody and cellular immune responses. In the present study, we evaluated the *Salmonella enterica* FliC*d* flagellin as a T cell vaccine adjuvant using as model the 9-mer (SYVPSAEQI) synthetic $H2^d$-restricted $CD8^+$ T cell-specific epitope ($CS_{280–288}$) derived from the *Plasmodium yoelii* circumsporozoite (CS) protein. The FliC*d* adjuvant effects were determined under two different conditions: (i) as recombinant flagella, expressed by orally delivered live *S. Dublin* vaccine strains expressing the target $CS_{280–288}$ peptide fused at the central hypervariable domain, and (ii) as purified protein in acellular vaccines in which flagellin was administered to mice either as a recombinant protein fused or admixed with the target $CS_{280–288}$ peptide. The results showed that $CS_{280–288}$-specific cytotoxic $CD8^+$ T cells were primed when BALB/c mice were orally inoculated with the expressing the $CS_{280–288}$ epitope *S. Dublin* vaccine strain. In contrast, mice immunized with purified FliC*d* admixed with the $CS_{280–288}$ peptide and, to a lesser extent, fused with the target peptide developed specific cytotoxic $CD8^+$ T cell responses without the need of a heterologous booster immunization. The $CD8^+$ T cell adjuvant effects of flagellin, either fused or not with the target peptide, correlated with the in vivo activation of $CD11c^+$ dendritic cells. Taken together, the present results demonstrate that *Salmonella* flagellins are flexible adjuvant and induce adaptative immune responses when administered by different routes or vaccine formulations.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The bacterial flagellar whip-like filament is a polymeric structure constituted by a single protein, flagellin. Endowed with a unique structural/functional organization, *Salmonella enterica* can express different flagellin types with molecular weights of approximately 55 kDa that represent key elements for survival at diverse environments, including the mammalian gastrointestinal tract. One *Salmonella* flagellar filament is composed of up to 100,000 flagellin subunits, which polymerize by means of highly conserved α-helix-containing N- and C-terminal chain sequences flanking a central hypervariable domain [1]. The central *Salmonella* flagellin domain encompasses a sequence stretch of approximately 200 amino acids, in a total content of 505 residues, which contains most of the B cell epitopes used for the serotyping of the antigen H (flagella) of the several distinct serovars [2].

Bacterial flagellins can also trigger different cellular responses, including activation of innate immune responses and apoptosis, by interacting with receptors found both at the surface and in inside of mammalian cells [3,4]. Interaction of flagellin monomers with the cell surface Toll-like receptor 5 (TLR5) initiates a signaling cascade that culminates with the production of pro-inflammatory cytokines, such as TNF-α, IL-6 and IL-12, and up-regulation of cell surface molecules involved in antigen presentation, such as MHC, CD40, CD80 and CD86 [5–7]. The interaction of flagellin with TLR5 involves N- (aa 44–129) and C- (aa 406–454) terminal hydrophobic motifs, required for flagellin polymerization into the flagellar filament, but that are exposed only on flagellin monomers released during infection by *Salmonella* [7,8].

The pro-inflammatory effects induced by bacterial flagellins, particularly those expressed by *Salmonella* strains, have been explored as natural adjuvants that bridge innate and adaptive immune responses [9]. Alternatively, flagellins can be employed as

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3091 7338; fax: +55 11 3091 7354.
E-mail address: lcsf@usp.br (L.C.S. Ferreira).

0264-410X/$ – see front matter © 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.vaccine.2009.11.003

macromolecular carriers in which heterologous peptide sequences or whole proteins are fused by chemical or genetic engineering techniques [10–14].

Several reports describe the strong adjuvant effects, both for humoral and cellular immune responses, observed in animals immunized via mucosal or parenteral routes with vaccine formulations containing the target antigen either admixed with purified flagellin monomers or genetically fused to the flagellin C-terminal end [10–14]. Indeed, even before the elucidation of the role of innate immunity on activation of adaptive immune responses, flagellins have been used to compose vaccine formulations. Such formulations were based on attenuated *Salmonella* strains genetically modified to express chimeric flagella carrying heterologous epitopes fused in frame at the central hypervariable domain of Fli*Cd*, a flagellin type encoded by some *S. enterica* serovars, such as *S. Typhi* and *S. Muenchen* [15–17]. However, a comparison of the two immunization strategies, based on purified soluble flagellin or flagellated *Salmonella* strains, with regard to specific $CD8^+$ T cell responses has not been conducted.

In the present report, we performed a series of immunization experiments aiming at the evaluation of *Salmonella* Fli*Cd* flagellin adjuvant effects on the $CD8^+$ T cell response to an epitope present in the *Plasmodium yoelii* circumsporozoite (CS) protein. Previous evidence demonstrated that immunity to malaria *P. yoelii* sporozoites is mainly mediated by interferon gamma (IFN-γ)-producing $CD8^+$ T cells [18] and that a single $CD8^+$ T cell epitope ($CS_{280–288}$) is the major target for the immune control of different murine malaria parasites [19–23,25].

Aiming the development of vaccine formulations able to elicit T cell responses, we evaluated the immunogenicity of the CS-specific $CD8^+$ T cell epitope in mice submitted to different immunization regimens. In the first approach, the $CS_{280–288}$ peptide was genetically fused into the hypervariable region of Fli*Cd* flagellin and expressed in the hybrid flagella of attenuated *S. Dublin* strains delivered orally. In a second approach, we determined the flagellin $CD8^+$ T cell adjuvant effects after immunization of mice, via parenteral and mucosal routes, using purified Fli*Cd* admixed with the synthetic peptide or as a recombinant protein carrying the target peptide genetically fused at the central hypervariable domain.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, plasmids and growth conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 1. The *S. Dublin* SL5928 strain is a non-flagellated *aro*A attenuated vaccine strain [16]. The *S. Dublin* SL5930 strain is derived from SL5928 after transformation with pLS408 encoding the *fliCd* gene, originally derived from *S. Muenchen*, with a 48 bp deletion generated after removal of a EcoRV–EcoRV fragment from the central hypervariable domain leading to a single EcoRV site used for in frame insertion of nucleotide sequences encoding heterologous epitopes. All *S. Dublin* and *Escherichia coli* strains were routinely cultivated at 37 °C under agitation (200 rpm) in Luria Bertani (LB) broth or on LB agar plates supplemented with ampicillin (100 μg ml^{-1}).

2.2. Generation of hybrid flagellins genetically fused to the $CS_{(280–288)}$ epitope

Complementary 27-base oligonucleotides CS1 (5′-AGC TAT GTG CCG AGC GCG GAA CAG ATT-3′) and CS2 (5′-AAT CTG TTC CGC GCT CGG CAC ATA GCT-3′), encoding the $CD8^+$ T cell epitope of the *P. yoelii* CS protein ($CS_{280–288}$) (SYVPSAEQI), were melted at 65 °C, annealed by slow cooling at room temperature and blunt end ligated with T4 DNA ligase into EcoRV cleaved pLS408. The same procedure was repeated with CS1K and CS2K oligonucleotides that, in addition to the sequence encoding the $CS_{280–288}$ epitope, carry on both 5′ and 3′ ends the sequence "AAA AAA", encoding two additional lysines flanking the heterologous epitope (KKSYVPSAEQIKK) genetically fused to Fli*Cd* flagellin. Ligation products were introduced by electroporation (using 0.2 cm electroporation cuvettes at 600 Ω, 25 μF and 1.75 kV) (Gene-Pulser, Biorad) into the *E. coli* DH5α strain and transformants were selected on LB plates plus ampicillin. Recombinant plasmids carrying the right inserts were screened by EcoRV digestion and sequenced with Big Dye terminator DNA sequencing kit (Perkin-Elmer Applied Biosystem) using a 15-mer primer (5′-CCA GGT GCC TAC ACC CCG-3′) corresponding to a sequence located 50 bp downstream the EcoRV insertion site in pLS408. The recombinant plasmids encoding Fli*Cd* genetically fused to $CS_{280–288}$ epitope (SYVPSAEQI) or the same epitope flanked with two additional lysines (KKSYVPSAEQIKK) were named pCS and pCSL, respectively. Finally, the pCS and pCSL plasmids were introduced into the flagellin-negative *S. Dublin* SL5928 strain by electroporation and the recombinant vaccine strains named SLCS and SLCSL strains, respectively.

2.3. Purification of Salmonella flagellins

Salmonella flagellins, comprising Fli*Cd*, FliCd-CS and FliCd-CSL, were harvested from the respective *S. Dublin* SL5930, SLCS and SLCSL strains according to a previously described procedure [26]. Briefly, flagellins were obtained after centrifugation of cells, suspension in phosphate-buffered saline (pH 7.4), shearing in a bench mixer at maximal speed (1 min treatment repeated three times), and another centrifugation step to remove the bacterial cells. Broken flagella fragments were precipitated with acetone, suspended in phosphate-buffered saline (PBS) and submitted to a heat treatment (65 °C for 30 min) to dissociate the flagellin filaments into monomers. Protein concentration was determined using the BCA assay (Pierce) and purity of the protein preparations monitored by SDS-PAGE. Removal of contaminating lipopolysacharide (LPS) was accomplished with Detoxi-Gel columns (Pierce) according to the manufacturer instructions. Endotoxin levels of the protein preparations were determined using the Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate assay (Cambrex Bio Science), were below 3.0 EU/μg of protein.

2.4. SDS-PAGE and immunoblot analysis

SDS-PAGE was performed following standard procedures using a Mini Protean II vertical electrophoresis unit. Proteins sorted in 12% polyacrylamide gels were stained with Comassie Blue or transferred to nitrocellulose membranes (0.45 μm pore size) at 100 mA for 1 h. After overnight blocking with 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in phosphate-buffered saline (PBS) at 4 °C, the nitrocellulose membranes were incubated at room temperature for 1 h with mouse anti-Fli*Cd* specific serum followed, after three washing steps, by incubation with 1:3000 PBS-diluted rabbit anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (SouthernBiotechnology). Reactive bands were developed with a chemoluminescence kit (Super Signal, Pierce), as specified by the manufacturer, and exposed to Kodak X-Omat films for 1–5 min.

2.5. Motility assays

In vitro motility of the recombinant *S. Dublin* strains was assessed by inoculation of the each strain in the center of motility agar plates (containing 1% tryptone, 1% NaCl, 0.35% agar, and, when necessary, supplemented with ampicillin at 100 μg ml^{-1}).

Table 1
S. Dublin strains and plasmids used in the present study.

	Relevant characteristics	Reference
Strains		
SL5928	*aro*A$^-$; *fliC*(*g,p*)::Tn10; nonmobile	Newton et al. (1989)
SL5930	SL5928 with the pLS408; mobile	Newton et al. (1989)
SLCS	SL5928 with the pCS; nonmobile	This study
SLCSL	SL5928 with the pCSL; nonmobile	This study
Plasmids		
pLS408	pUC19 derivative carrying the *fliCd* gene from *S. Muenchen* with a deletion of 48 bp (EcoRV–EcoRV fragment), *bla*	Newton et al. (1989)
pCS	pLS408 derivative with a 27 bp of the insert encoding the $CS_{280-288}$ epitope	This study
pCSL	pLS408 derivative with a 39 bp of the insert encoding the $CS_{280-288}$ epitope with two end-flanking lysines residues	This study

Plates were incubated at 37 °C, and the sizes of growth halos were measured at different intervals.

2.6. Immunization regimens

Pathogen-free female BALB/c ($H2^d$) mice with 8–12 weeks old were supplied by the Isogenic Mouse Breeding Facility of the Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, São Paulo University (USP). All animal handlings were carried out in accordance with the principles of the Brazilian code for the use of laboratory animals and were approved by the committee on ethical use of laboratory animals from the Institute of Biomedical Sciences, USP. Immunizations with viable *S. Dublin* strains were performed with bacterial cells harvested during exponential growth (optical density at 600 nm of 0.8). Bacteria were washed with PBS and suspended in 0.1 M sodium bicarbonate at a final concentration of 2×10^{10} CFU ml^{-1}. Mice were immunized per oral route (p.o.) with 0.5 ml aliquots of the bacterial suspensions with the aid of a stainless steel round-tip gavage cannule on days 0, 21 and 35. For the evaluation of the priming effect promoted by the orally delivered *S. Dublin* vaccine strains, mice were boosted via subcutaneous route (s.c.) two weeks after the last immunization with 25 μg of the synthetic $CS_{280-288}$ peptide (PSL, Heidelberg, Germany) suspended in Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) (1:1, v:v). Animals were also immunized with purified flagellins harvested from the *S. Dublin* vaccine strains, either as a soluble protein adjuvant admixed with the synthetic $CS_{280-288}$ peptide or as recombinant proteins genetically fused with the heterologous target epitope (FliCd-CS or FliCd-CSL). For the intranasal (i.n.) immunizations, 15 μg of each fusion protein or a mixture of 5 μg Fli*Cd* flagellin plus 25 μg $CS_{280-288}$ peptide were instilled with a micropipette into the mouse nostrils (5 μl/nostril) on days 0 and 21. The same immunization schedule was followed for the s.c. immunizations but with an injection volume of 100 μl containing either the recombinant flagellins or the synthetic $CS_{280-288}$ peptide plus Fli*Cd* suspended in PBS. Control mouse groups received sterile PBS, via i.n. or s.c. routes, and 25 μg the $CS_{280-288}$ peptide suspended in Complete Freund's Adjuvant (CFA) (1:1, v:v) via the s.c. route. Animals were sacrificed 7 days after the last immunization dose for determination of $CD8^+$ T cell responses or used for in vivo determination of the induced cytotoxic responses.

2.7. Comparative analyses of in vitro and in vivo biological activity of the flagellins

Determination of in vitro bioactivity of the native or hybrid flagellins was carried out using HEK293 cells expressing mouse TLR5 (Invivogen) that controls activation of human IL-8 expression. The cells were maintained in DMEM media containing 10% FBS and 10 μg ml^{-1} of blasticidin. Non-transfected or TLR5-transfected HEK293 cells (5×10^4 cells/well) were grown overnight in 96-well plates and stimulated with the proteins for 5 h. The culture supernatants were collected and the concentration of secreted human IL-8 measured using a Human IL-8 ELISA Kit (BD biosciences), as recommended by the manufacturer. Evaluation of the in vivo flagellin biological activity was determined by the transient expression of IL-6 in sera of BALB/c mice following i.p. inoculation of 5 μg of purified flagellin (Fli*Cd*, FliCd-CS, or FliCd-CSL). Serum samples were collected on different time points and the concentration of IL-6 was measured using a Mouse IL-6 ELISA Kit (BD biosciences), according to the manufacturer. Cytokine concentration in each experiment was determined using standard curves with purified recombinant human IL-8 and mouse IL-6. The detection limit of the assay was 0.2 ng ml^{-1} and 1 ng ml^{-1}, for IL-8 and IL-6, respectively.

2.8. In vivo activation of dendritic cells (DCs)

BALB/c mice were immunized i.p. with 25 μg of *S. Typhimurium* lipopolysaccharide (LPS) (Sigma), 5 μg of Fli*Cd* or 15 μg of FliCd-CS. Twenty-four hours later, spleens were removed, cut into small pieces and digested for 30 min at 37 °C in RPMI containing 10% FBS containing 400 U ml^{-1} of type IV collagenase (Gibco). The reaction was stopped after 5 min incubation with 0.1 M EDTA. The cells were recovered and washed three times with RPMI with 10% FBS and stained with either PE-labeled anti-CD11c, APC-labeled anti-CD86, APC-labeled anti-CD40, APC-labeled anti-CD80, FITC-labeled anti-H2kd, or FITC-labeled anti-H2Iad (BD Biosciences). Samples were resuspended in PBS and analyzed (3×10^6 events) in a FACSCalibur™ (Becton Dickinson) flow cytometer. The data were analyzed using the FlowJo software (Tree Star).

2.9. Determination of $CD8^+$ T cell response by IFN-γ ELISPOT assays

IFN-γ ELISPOT assays of activated $CD8^+$ T cells responding to the $H2^d$-restricted $CD8^+$ T cell-specific *P. yoelii* CS-derived SYVPSAEQI peptide were performed essentially as previously described [26]. Briefly, spleen cells (10^6) collected from the different immunization groups were added to microplate wells (MultiScreen, Millipore) previously coated with 10 μg ml^{-1} of anti-IFN-γ capture antibody (BD Pharmingen) diluted in PBS. The cells were then incubated overnight with the synthetic $CS_{280-288}$ peptide at a final concentration of 2.5 μg ml^{-1}. Anti-CD3 (BD Pharmingen) was used as a positive control at a final concentration of 0.25 μg ml^{-1}. Plates were incubated overnight at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere. After incubation, wells were washed and incubated with 2 μg ml^{-1} of biotinylated anti-mouse IFN-γ (BD Pharmingen) diluted in PBS and 0.05% Tween 20 (PBS–T). Plates were washed and incubated with peroxidase-conjugated streptoavidin diluted 1:800 in PBS. Spots, representing IFN-γ producing $CD8^+$ T cells, were developed according to standard procedures [26] and quantified using an automated ImmunoScan reader (Cellular Technology Ltd.). All samples were tested in duplicates and each immunization experiment was independently repeated at least two times.

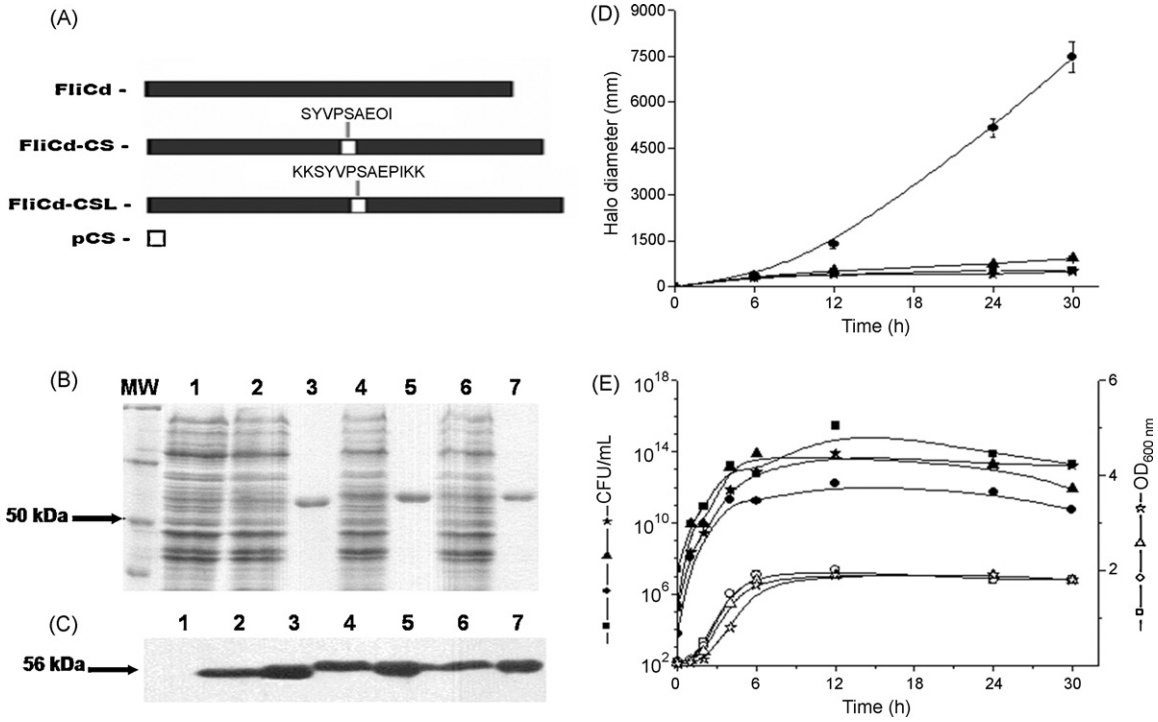


Fig. 1. Generation of recombinant Fli*Cd* flagellins genetically fused to the *P. yoelii* CS-epitope ($CS_{280-288}$). (A) Schematic representation of the recombinant flagellins containing the ($CS_{280-288}$) epitope inserted at the Fli*Cd* central hypervariable domain without (FliCd-CS) or with (FliCd-CSL) two flanking lysine residues. (B) Comassie blue-stained polyacrylamide gel loaded with whole-cell extracts or purified flagellins harvested from the *S. Dublin* SLCS and SLCSL vaccine strains. Samples: MW, molecular weight markers; lane 1, whole-cell extract of the non-flagellated *S. Dublin* SL5928 strain; lane 2, whole-cell extract of the *S. Dublin* SL5930 strain encoding Fli*Cd* without a heterologous insert; lane 3, purified Fli*Cd* flagellin isolated from the SL5930 strain; lane 4, whole-cell extract of the *S. Dublin* SLCS strain expressing the FliCd-CS flagellin; lane 5, purified FliCd-CS flagellin; lane 6, whole-cell extract of the *S. Dublin* SLCSL strain; lane 7, purified FliCd-CSL flagellin. (C) Detection of proteins recognized by anti-Fli*Cd* antibodies in Western blot. Whole-cell extracts or purified flagellins were initially separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and developed for reactive bands after incubation with the anti-flagellin serum. The order of the protein samples applied on the gel was the same described in (B). Each well was loaded with approximately 25 μg of whole-cell extract or 2 μg of purified flagellins. (D) In vitro motility of *S. Dublin* vaccine strains in semi-solid agar plates at 37 °C. Tested strains: SL5928 (square), SL5930 (circle), SLCS (triangle) and SLCSL (asterisk). The *S. Dublin* strains were spotted on the center of motility plates and the growth halos measured for a period of 30 h. (E) Growth curves of the different *S. Dublin* strains in LB medium. Open symbols denote optic density ($O.D._{600}$) and closed symbols denote colony forming units per ml (CFU ml^{-1}) of the different *S. Dublin* strains: SL5928 (squares), SL5930 (circles), SLCS (triangles), SLCSL (asterisks). The strains were cultivated in LB medium plus ampicilin (except SL5928 strain).

2.10. In vivo cytotoxicity lymphocyte (CTL) assays

Splenocytes collected from naive mice were stained with 1 μM or 10 μM of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (Invitrogen). Cells labeled with 10 μM CFSE, but not those labeled with 1 μM CFSE, were pulsed for 40 min at 37 °C with 1 μM of the $CS_{280-288}$ peptide. The two cell populations were i.v. transferred (2×10^7 cells each/animal) to mice submitted to the different immunization regimens. One day later, spleens of inoculated mice were isolated and the two CFSE-labeled cell populations were monitored by flow cytometry in a FACSCalibur™. The percentages of target cell killing were determined as previously described [26].

2.11. Statistical analyses

Data were analyzed by one-way ANOVA test followed by Tukey HSD tests. Differences with $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

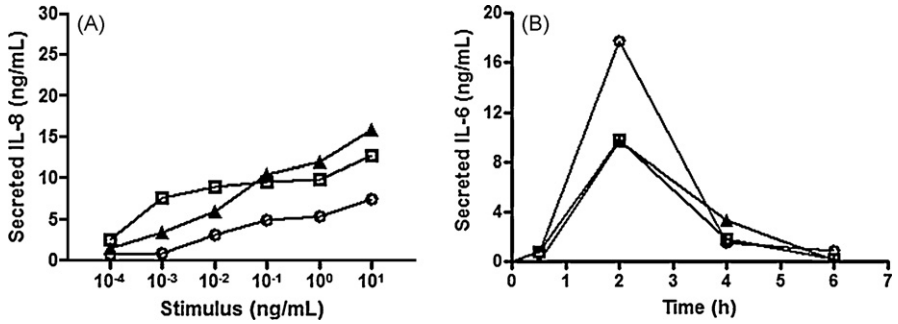


Fig. 2. Characterization of the in vitro and in vivo biological activity of the native and hybrid flagellins. (A) Human IL-8 secretion by TLR5-transfected HEK293 cells following stimulation with different concentrations of native Fli*Cd* (squares), FliCd-CS (triangules) or FliCd-CSL (circles) flagellins during 5 h. The values of the IL-8 secretion by non-transfected HEK293 cells were deducted from the values obtained with transfected cells submitted to the same stimuli. (B) Mouse IL-6 secretion following i.p. injection of native Fli*Cd* (square), FliCd-CS hybrid (triangle) and FliCd-CSL (circle) flagellin in BALB/c mice. Data are representative of two independent experiments with similar results. The secreted human IL-8 and mouse IL-6 values were determined in culture supernatant and serum samples by capture ELISA. No statistically significant differences were observed among the groups.

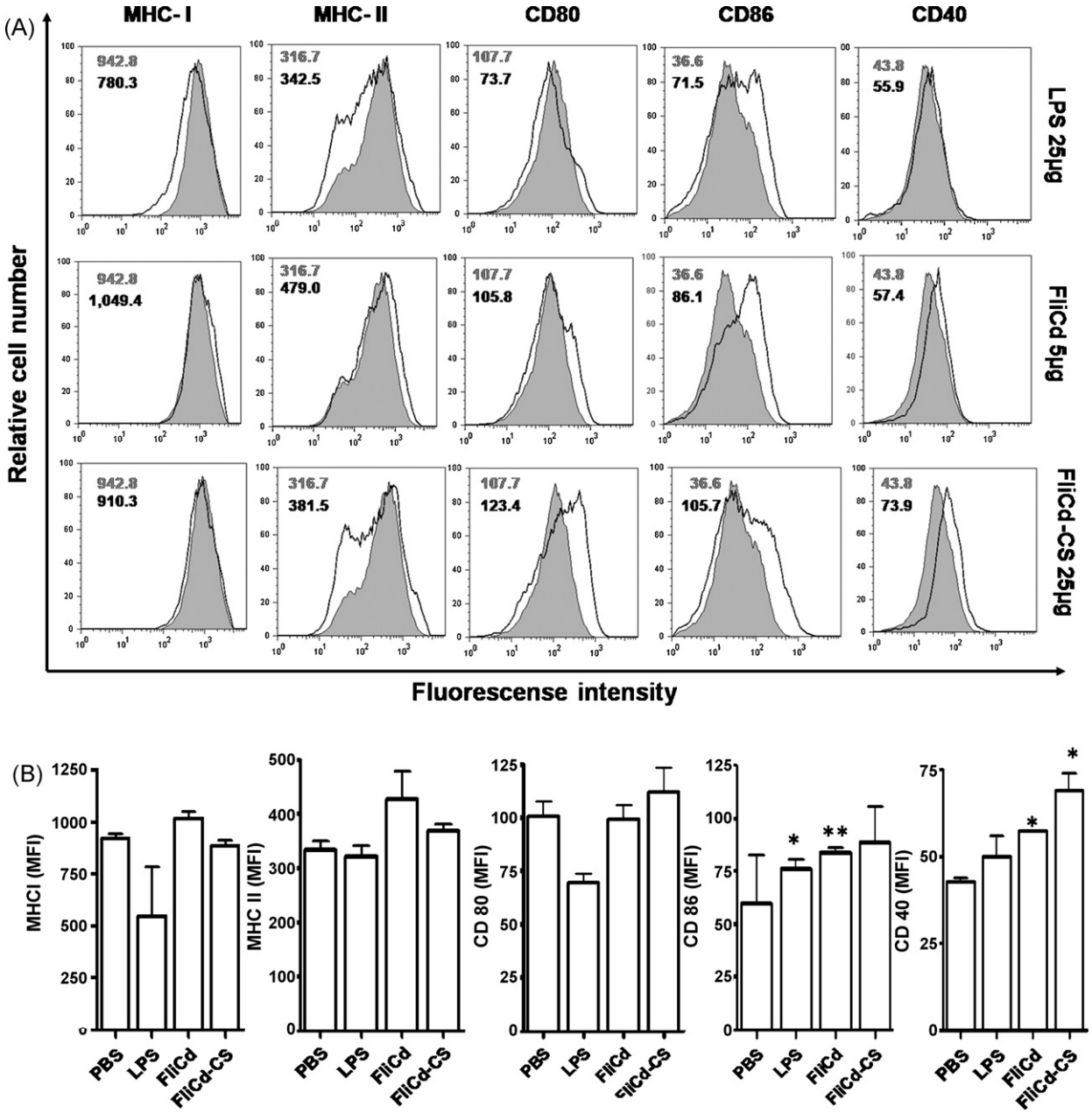


Fig. 3. Expression of surface molecules by CD11c$^+$ cells following administration of flagellins to mice. BALB/c mice were immunized i.p. with LPS, FliCd or FliCd-CS. Twenty-four hours after the injection, spleen cells were stained with PE-labeled anti-CD11c, APC-labeled anti-CD86, APC-labeled anti-CD40, APC-labeled anti-CD80, FITC-labeled anti-H2Kd, or FITC labeled anti-H2Iad. Histograms representing non-treated (PBS) samples are indicated by lines delimiting gray-shadowed curves. Samples collected from mice submitted to the different treatments are represented by lines delimiting non-shadowed curves. Treatments: 5 μg of Fli*Cd*, 15 μg of FliCd-CS flagellin and 25 μg of LPS. The expression of surface markers was analyzed by acquiring 3×10^6 events. Cells gated for CD11c$^+$ expression are depicted as histograms (A) and bars with the mean fluorescence intensity values shown in (B). $^*p < 0.05$ or $^{**}p < 0.01$ indicates statistically significant difference compared with results obtained with mice treated with PBS.

3. Results

3.1. Construction and expression of hybrid flagellins carrying the *P. yoelii* $CS_{280-288}$ CD8$^+$ T cell epitope

Two experimental approaches based on the $CS_{280-288}$ CD8$^+$ T cell-restricted epitope as a model peptide antigen were designed to evaluate the adjuvant effects of the *S. Dublin* Fli*Cd* flagellin. In the first vaccine approach, we tested attenuated *S. Dublin aro*A vaccine strains expressing chimeric flagellins fused in frame with the heterologous epitope at the central hypervariable domain, as shown in Fig. 1A. Two plasmids carrying recombinant flagellin-encoding genes were generated: the pCS vector encoding a chimeric flagellin fused with the nine amino acid residues $CS_{280-288}$ epitope, and the pCSL vector carrying the same $CS_{280-288}$ epitope flanked by two lysine residues, a strategy previously shown to improve processing and presentation of heterologous T cell epitope by antigen presenting cells [17]. The plasmids were introduced into the *aro*A *S. Dublin* SL5928 strain. Fig. 1B shows that the *S. Dublin* SLCS strain, transformed with the pCS vector, and the SLCSL strain, transformed with the pCSL vector, were flagellated and expressed the recombinant flagellins with slightly altered molecular weights on their cell surface. The hybrid flagellins were detected in immunoblots prepared with whole-cell extracts of the *S. Dublin* vaccine strains or purified protein harvested from the surface of the *Salmonella* vaccine strains (Fig. 1C). However, none of the *Salmonella* vaccine

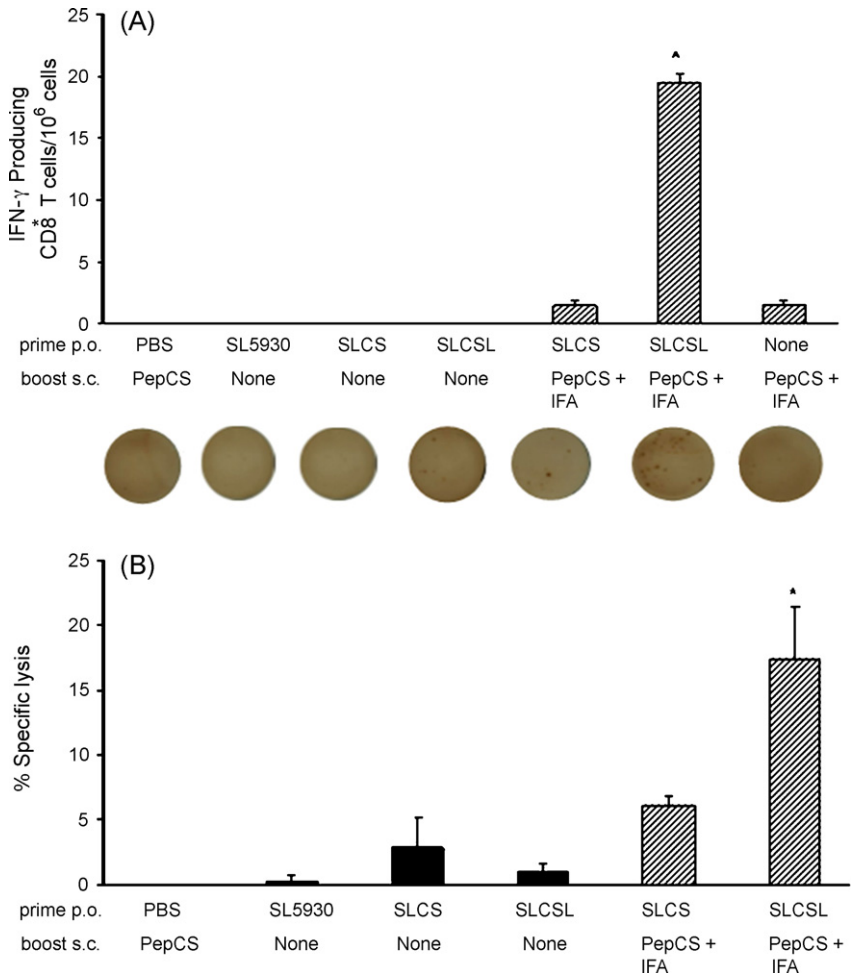


Fig. 4. Induction of specific CD8$^+$ T cell-mediated IFN-γ production in ELISPOT assays carried out with cells collected from BALB/c mice immunized with the *S. Dublin* vaccine strains. Mice were immunized (three p.o. doses containing 10^{10} cells) on days 0, 21 and 35 with live *Salmonella* vaccine strains or submitted to a prime-boost immunization regimen consisting of three doses of the *Salmonella* vaccine strains followed, 2 weeks later, by a single s.c. boost containing 25 μg of the synthetic peptide admixed with IFA. (A) IFN-γ-producing cells determined by ELISPOT using spleen cells harvested from vaccinated mice and stimulated with the SYVPSAEQI peptide. The results represent the mean of peptide-specific IFN-γ producing cells per 10^6 splenocytes ± SD ($n = 4$). Bottom panels show one representative well of the ELISPOT assay carried out with animals of each immunization group. (B) In vivo cytotoxic responses raised in vaccinated mice using target spleen cells coated with SYVPSAEQI peptide and labeled with CFSE, according to the procedure described in Section 2. The results represent the mean of five mice ± SD per group. Results are based on a representative experiment of two or more independent repetitions. Asterisks denote statistically significant differences ($p \leq 0.05$) observed in mice immunized with the recombinant *Salmonella* vaccine strains with regard to mice immunized with a single dose of the CS peptide admixed with IFA.

strains were motile in semi-solid agar plates, suggesting that insertion of the heterologous peptide renders the recombinant flagella non-functional as locomotion devices (Fig. 1D). In spite of the differences in flagellar function, both *S. Dublin* vaccine strains have similar growth rates under in vitro conditions with regard to the non-flagellated strain (Fig. 1E). Finally, the pCS and pCSL vectors proved to be stable in the *S. Dublin* host following cultivation in antibiotic-free media for 72 h or in colonies recovered from spleen and the five Peyer's patches collected 24 h after oral administration to mice (data not shown).

3.2. Biological activity of recombinant flagellins

Following the fusion of the $CS_{280-288}$ epitope to FliC*d*, we determined the biological activities of recombinant proteins either in vitro, based on the secretion of human IL-8 by TLR5-expressing HEK293 cells, or in vivo, by the transient secretion of IL-6 in the serum of inoculated mice. As demonstrated in Fig. 2A, FliC*d* and FliCd-CS show similar IL-8 production by HEK293 cells over a rather high concentration range, while, under the same conditions, cells exposed to FliCd-CSL induced lower IL-8 amounts. In contrast, under in vivo conditions (Fig. 2B), FliCd-CSL showed higher inflammatory activity measured by the IL-6 serum levels 2 h following parenteral administration to BALB/c mice. Collectively, these results shown that fusion of the $CS_{280-288}$ epitope to the flagellin central hypervariable domain did not abrogate both in vitro and in vivo biological activities of FliC*d*.

3.3. Activation of CD11c$^+$ dendritic cells in mice immunized with flagellins

Groups of BALB/c mice were injected i.p. with FliC*d* flagellin, or the recombinant FliCd-CS flagellin, and splenic CD11c$^+$ dendritic cells were monitored for expression of MHC-I and MHC-II molecules as well as the markers of the activation CD80, CD86 and CD40. *Salmonella* LPS was injected in another mouse group to evaluate the effects of another innate immunity agonist on these cells. Following 24 h of the parenteral administration of the FliC*d* and FliCd-CS flagellins, and LPS, the CD11c$^+$ dendritic cells were up-regulated for the expression of CD86, CD40 and MHC-II. On other hand, LPS promoted down-regulation of the expression of MHC-I and CD80 molecules (Fig. 3A). Measurement of the fluorescence

intensity showed that CD40 expression in cells exposed to the flagellins was statistically significant when compared to non-treated cells (Fig. 3B). These results indicated that administered flagellins promote in vivo activation of CD11$^+$ dendritic cells thus favoring their ability to antigen presentation.

3.4. Immunogenicity of the attenuated S. Dublin strains expressing the $CS_{280-288}$ epitope genetically fused to FliCd

The induced CS-specific CD8$^+$ T cell-dependent responses were determined in BALB/c mice orally immunized with the *S. Dublin* strains. The IFN-γ production detected after stimulation of spleen cells with the synthetic $CS_{280-288}$ peptide showed that mice immunized with three oral doses, containing 10^{10} live bacterial cells, of the *S. Dublin* SLCS or SLCSL strains did not present any detectable specific CD8$^+$ T cell response (Fig. 4A). Nonetheless, when mice were subsequently boosted two weeks later with a single parenteral dose containing the synthetic $CS_{280-288}$ peptide admixed with IFA, at a concentration that did not induce a significant specific CD8$^+$ T cell activation, we observed a positive CD8$^+$ T cell response in mice primed with the *S. Dublin* SLCSL, but not in those immunized with the SLCS strain (Fig. 4A). In vivo determination of cytotoxic CD8$^+$ T cell responses in mice submitted to the same vaccine regimen with the *S. Dublin* strains gave similar results (Fig. 4B). Taken together, these results indicate that addition of two flanking lysine residues to the CS-epitope inserted in the flagellin sequence enhanced the priming effect on CD8$^+$ T cells in mice orally immunized with live *Salmonella* vaccine formulations.

3.5. CD8$^+$ T cell adjuvant effect of flagellin in mice immunized with purified flagelins and the synthetic $CS_{280-288}$ epitope

The CD8$^+$ T cell adjuvant effect of Fli*Cd* was also evaluated with purified hybrid flagellins, harvested from the *S. Dublin* SLCS and SLCSL strains, and the synthetic $CS_{280-288}$ peptide admixed with native Fli*Cd* flagellin. In both cases the acellular vaccine formulations were delivered via parenteral (s.c.) or mucosal (i.n.) routes to BALB/c mice. As demonstrated in Fig. 5, the FliCd-CS and FliCd-CSL flagellins activated antigen-specific CD8$^+$ T cells following parenteral administration to mice. In contrast, administration of the vaccine formulations via the mucosal route did not induce statistically significant CD8$^+$ T cell responses when compared with PBS immunized mice. On the other hand, mice immunized with the synthetic $CS_{280-288}$ peptide admixed with Fli*Cd* flagellin elicited specific CD8$^+$ T cell responses following both parenteral and mucosal immunizations. As a positive control, mice immunized s.c. with two doses of the $CS_{280-288}$ peptide admixed with CFA induced positive, but lower, CD8$^+$ T cell responses. A determination of CS-specific cytotoxic responses in mice immunized with different vaccine formulations showed that only animals

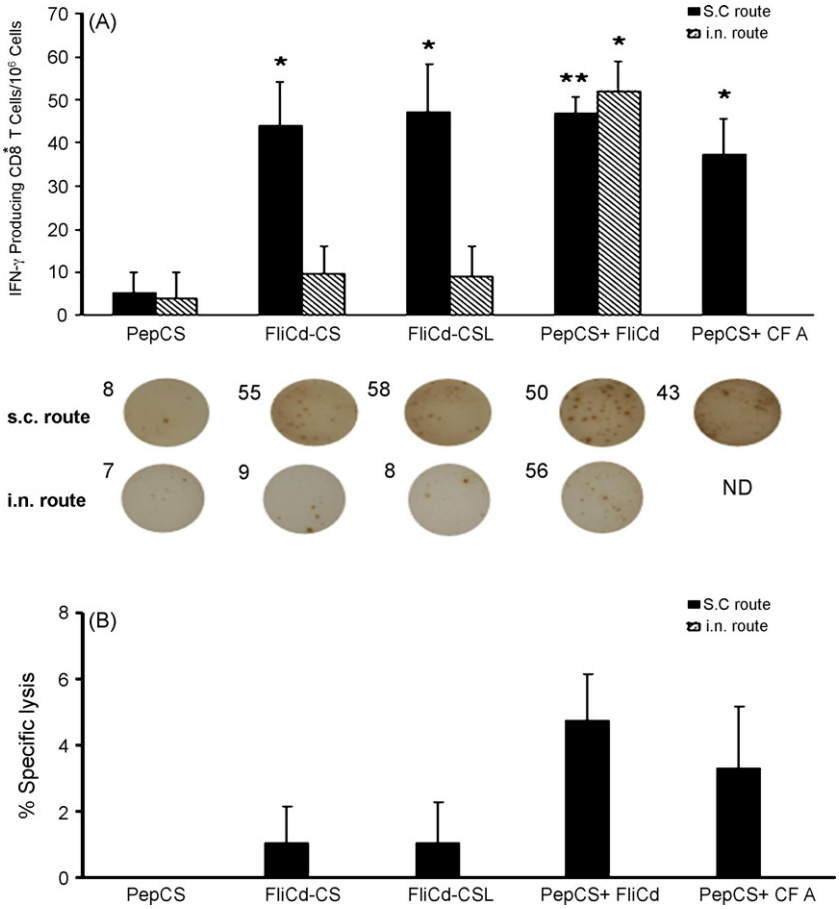


Fig. 5. Induction of specific CD8$^+$ T cell-mediated IFN-γ production in ELISPOT assays carried out with BALB/c mice immunized with purified flagellins. Mice were immunized via parenteral (s.c.) or mucosal (i.n.) routes with 15 μg of each fusion protein or with 5 μg of the Fli*Cd* flagellin plus 25 μg of the synthetic CS peptide on days 0 and 21. A control group was set with mice immunized with two doses of the CS peptide admixed with CFA s.c. delivered under the same vaccine regimen. (A) IFN-γ producing T cells using spleen cells harvested from vaccinated mice and stimulated with the SYVPSAEQI peptide. The results represent the mean number of peptide-specific IFN-γ producing cells per 10^6 splenocytes ± SD ($n = 4$). Bottom panels show one representative well of the ELISPOT assay carried out with animals of each immunization group. (B) In vivo cytotoxic responses elicited in vaccinated mice using target spleen cells coated with SYVPSAEQI peptide and labeled with CFSE, according to the procedure described in Section 2. The results represent the mean of five mice ± SD per group. Results are representative of three independent experiments. Asterisks denote statistically significant differences with regard to animals immunized only with the synthetic peptide. $^*p \leq 0.05$ and $^{**}p \leq 0.02$.

s.c. immunized with the formulation in which the synthetic peptide was co-delivered with flagellin or CFA were able to activate in vivo cytotoxic CD8$^+$ T cell responses (Fig. 5B).

4. Discussion

In the present study, we evaluated the adjuvants effects of the *Salmonella* FliC*d* flagellin using as model the *P. yoelli* $CS_{280–288}$ peptide, a CD8$^+$ T cell-specific epitope. Based on a unique experimental design, we investigated the *Salmonella* FliC*d* flagellin under different administration contexts, which ranged from hybrid flagella expressed by attenuated *Salmonella* vaccine strains to purified flagellins genetically fused to the target epitope or admixed with the synthetic $CS_{280–288}$ peptide, delivered via parenteral and mucosal routes. Based on our observations, we concluded that the *Salmonella* flagellin can be used as a CD8$^+$ T cell adjuvant either as a chimeric protein genetically fused to the target peptide or in a vaccine formulation containing the synthetic peptide admixed with the purified FliC*d* flagellin. These results expand the knowledge on the T cell adjuvant effects of *Salmonella* flagellins and further demonstrate the flexibility of this molecule concerning both composition of the vaccine formulation and delivery routes.

Initially, we determined whether the insertion of the CS-epitope into the flagellin hypervariable domain would ablate, both in vitro and in vivo, the flagellin ability to bind the TLR5 receptor. The parameter used for comparison was the quantification of human IL-8 in the culture supernatant of HEK293/TLR5+ cells stimulated with flagellins FliCd, FliCd-CS and FliCd-CSL. All flagellins induced similar amounts of IL-8, suggesting that binding affinity to TLR5 was preserved in the recombinant flagellins. Similarly, quantification of IL-6 in the serum of mice parenterally treated with purified flagellins showed that all three proteins had a similar inflammatory activity. Together these results show that the insertion of the small peptide sequence in the central region of flagellin preserved the TLR5-binding effect and activation MyD88-dependent signaling leading to secretion of pro-inflammatory cytokines. Fusion of heterologous proteins at the C-terminal end of flagellin have been shown to preserve both TLR5-binding and adjuvant effects [10–13,35]. However, in contrast to the fusion at the C-terminal end, insertion of short peptide sequences at the hypervariable domain usually does not disrupt flagellar assembly allowing the alternative use of flagellate recombinant *Salmonella* attenuated strains as orally delivered vaccine carriers.

Activation of adaptive immune responses by flagellins has been ascribed to the in vitro up-regulation of co-stimulatory molecules, such as CD80 and CD86, and MHC molecules on APCs [36]. In order to check if the FliC*d* and FliCd-CS flagellins were able to activate CD11c$^+$ dendritic cells, BALB/c mice were immunized i.p. with one dose of the each flagellin and had slight up-regulation of the CD86 and CD40. On other hand, the enhancement showed to CD80, MHC-I and MHC-II, although reproducibly detected, did not reach a statistically significant difference. In contrast, administration of purified LPS promoted down-regulation of MHC-I and CD80. These results show that the presence of LPS does not correlate with the in vivo adjuvant effects of flagellin but its presence in low amounts might explain the lack of up-regulation of the MHC and CD80 molecules in the CD11c$^+$ dendritic cells collected from mice treated with higher amounts of the recombinant and native flagellins (data not show). Therefore, our results show that monomeric native or hybrid flagellins activate APCs and enhance their ability to prime CD8$^+$ T cells.

After establishing that the recombinant flagellins preserve TLR5-binding activity and are capable to activate DCs in vivo, we evaluated the adjuvant effects of the flagellin on the activation of CD8$^+$ T cells in mice immunized with flagellate *S. Dublin* vaccine strains or with purified proteins. As initially proposed at the end of the 80 s by Newton et al. [37], insertion of heterologous epitopes at the central hypervariable domain of *Salmonella* flagellins represents a simple and elegant approach for the generation of bivalent oral vaccines, in which the target epitope is carried, at thousand copies, by the bacterial vector to the gut associated lymphoid tissues (GALT) maximizing epitope immunogenicity and avoiding undesirable sequences, such as those involved in auto-immune and suppressive immune responses. The general application of such vaccine approach was later abridged by observations describing that both flagellin and heterologous B cell epitopes have their immunogenicity considerable reduced when delivered orally by flagellated *Salmonella* strains [27,28]. In the present study, direct activation of epitope-specific CD8$^+$ T cells was not achieved in mice immunized with *S. Dublin* strains, but after prime with *S. Dublin* strains and boost with the synthetic peptide plus IFA, we detected CD8$^+$ T cells activated only in mice immunized with the SLCSL strain, that express CS-epitope flanked by lysine residues. Such result probably reflects the more efficient processing and presentation of heterologous peptides flanked by lysine residues which allows cathepsin B proteolytic epitope excision in the endosomal compartment and more efficient surface presentation of the target epitope by antigen presenting cells [17].

Heterologous prime-boost immunization regimens usually consist in a priming step with one vaccine type, such as naked DNA, and a subsequent boost with a different vaccine formulation or delivery vector, usually an attenuated genetically modified virus or purified protein. Although not considered a classical vaccine vector in prime-boost immunization regimens, *Salmonella* vaccine strains may either prime or boost specific humoral and cellular immune responses when combined in heterologous vaccine regimens with DNA vaccines [24,30,31]. Indeed, a prime-boost malaria immunization regimen showed that *Salmonella* vaccine strains efficiently primed humoral and cellular immune responses following optimization of codon usage and secretion of truncated forms of the *P. falciparum* CS protein in mice subsequently boosted with DNA vaccines [24,29]. Our results showed that CS-specific CD8$^+$ T cell responses can be achieved in mice submitted to a prime (*Salmonella*)-boost (synthetic peptide) immunization regimen following incorporation of flanking lysine residues to the target flagellin-fused epitope, but the weak immune response found suggests that this immunization protocol should be improved. Remarkably the activation of antigen-specific CD8$^+$ T cell responses in mice boosted with the synthetic peptide, otherwise a weak antigen, reveals that, even when administered via the oral route, recombinant flagellin expressed by attenuated *Salmonella* strains can be optimized for priming T cells and represent an alternative to DNA vaccines and recombinant viruses for immunization regimens targeting antigens derived from malaria parasites as well as other intracellular pathogens.

Epitope-based vaccines take advantage of a thoroughly characterized synthetic material with high safety status and known immunogenicity potential, thus reducing any potential risks of undesirable side effects. On the other hand, peptides usually suffer with the inherent low immunogenicity, as compared to cellular vaccines or purified proteins. Various experimental approaches have been tested in order to enhance the immunogenicity of synthetic peptides including the synthesis of tandem epitope repeats chemically to macromolecular carriers and generation of recombinant fusion proteins [32]. In the present study, we showed that the *Salmonella* FliC*d* flagellin, admixed or genetically fused to the $CS_{280–288}$ peptide, promoted specific CD8$^+$ T cell activation in vaccinated mice. Animals immunized via the parenteral route, developed epitope-specific CD8$^+$ T cell responses with all three flagellin preparations. However, among mice immunized via the i.n. route, only those immunized with the FliC*d* and $CS_{280–288}$ mixture mounted an epitope-specific CD8$^+$ T cell response. Similar results were also reported in mice immunized with the FliC

flagellin admixed with a synthetic peptide encompassing a CD4+ T cell epitope [14]. These results indicate that *Salmonella* flagellins show distinct T cell adjuvant effects according to the administration route and fusion of the heterologous peptide at the central hypervariable domain. Interestingly, results based on C-terminal fusion of flagellin with different heterologous proteins, showed that T cell-dependent immune responses are enhanced or only occur in animals immunized with hybrid flagellins [10,13,35]. More detailed analyses concerning the CD8+ T cell adjuvant effects of flagellin genetically fused at different positions with the same target epitope and flagellin admixed with the synthetic peptide should be carried in order to evaluate the most appropriate formulation for activation of T cell responses.

Functional characterization of the CD8+ T cell responses in mice immunized via mucosal or subcutaneous route with different flagelllins showed that administration the purified flagellins to mice did not elicited a stronger antigen-specific cytotoxic T cell response. CD8+ T lymphocytes promote cytotoxic effects by direct mechanisms, such as production of perforins, granzymes and FasL, or by indirect pathways, such as activation mediated by IFN-γ. Indeed, distinct CD8+ T cell populations may express cytokines in conjunction or not with cytotoxic effector molecules [33]. Therefore, our results suggest that mucosal administration of flagellin vaccine formulations activate CD8+ T cell populations different from those activated following parenteral immunization. Such differences might reflect either in delay of T cell maturation or activation in animals immunized via the nasal administration route. These observations also emphasize the relevance of functional assays on the analyses of T cell responses elicited in mice immunized with vaccine formulations targeting activation of CD8+ T cells.

Discovery that microbial-derived compounds are agonists of surface or intracellular innate immunity receptors expressed by APCs has opened up a new era for the development of vaccine adjuvants. Our results suggest the modulation of co-stimulatory molecule expression on APCs by flagellins is a discrete phenomenon but enough to promote cross-priming of specific CD8+ T cells. Indeed, it is known today that bacterial flagellins exert strong adjuvant effects via diverse mechanisms not exclusively related to TLR5 receptor binding [34]. Our present results show that both the adjuvant effects as well as the administration routes of *Salmonella* flagellins can be modify the quality of the immune response to a specific CD8+ T cell epitopes. Additional experimental studies and future clinical testing of bacterial flagellins may contribute to the development of improved vaccine adjuvants, particularly those acting on T cell epitopes.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo and the Millennium Institute for Vaccine Development and Technology. CJMB and DYB were supported by fellowships from FAPESP. LCSF, LLM and MMR were supported by fellowships from CNPq.

References

[1] Samatey FA, Imada K, Nagashima S, Vondeviszt F, Kumasaka T, Yamamoto M, et al. Structure of the bacterial flagella protofilament and implications for a switch for supercoiling. Nature 2001;410:331–7.
[2] Newton SMC, Wesley RD, Wilson A, Rosenberg LT, Miller JF, Stocker BAD. Segment IV of *Salmonella* flagellin specifies flagellar antigen epitopes. Mol Microbiol 1991;5:419–25.
[3] Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature 2001;410:1099–103.
[4] Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozoren N, Jagirdar R, et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1 beta in *Salmonella*-infected macrophages. Nat Immun 2006;7:576–82.
[5] Didierlaurent A, Ferrero I, Otten LA, Dubois B, Reinhardt M, Carlsen H, et al. Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. J Immunol 2004;172:6922–30.
[6] Ciacci-Woolvine F, Bloomfield IC, Richardson SH, Mizel SB. *Salmonella* flagellin induces tumor necrosis factor alpha in a human promonocytic cell line. Infect Immun 1998;66:1127–34.
[7] Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Barrett SL, et al. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. Nat Immun 2003;4: 1247–53.
[8] Eaves-Pyles TD, Wong HR, Odoms K, Pyles RB. *Salmonella* flagellin-dependent proinflammatory responses are localized to the conserved amino and carboxyl regions of the protein. J Immunol 2001;167:7009–16.
[9] Honko AN, Mizel SB. Effects of flagellin on innate and adaptive immunity. Immunol Res 2005;1:83–101.
[10] Cuadros C, Lopez-Hernandez FJ, Dominguez AL, McClelland M, Lustgarten J. Flagellin fusion proteins as adjuvants or vaccines induce specific immune responses. Infect Immun 2004;72:2810–6.
[11] Pino O, Martin M, Michalek SM. Cellular mechanisms of the adjuvant activity of the flagellin component FIjB of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to potentiate mucosal and systemic responses. Infect Immun 2005;73: 6763–70.
[12] Honko A, Sriranganathan N, Lees CJ, Mizel SB. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. Infect Immun 2006;74:1113–20.
[13] Huleatt JW, Jacobs AR, Tang J, Desai P, Kopp EB, Huang Y, et al. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. Vaccine 2007;25:763–75.
[14] Braga CJM, Rittner GMG, Henao JEM, Teixeira AF, Massis LM, Sbrogio-Almeida ME, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* vaccine formulations based on the gp43-derived P10 sequence and the *Salmonella enterica* FliC flagellin. Infect Immun 2009;77(4):1–8.
[15] Newton SMC, Kotb CM, Poider TP, Stocker BAD, Beachey EH. Expression and immunogenicity of a streptococcal M protein epitope inserted in *Salmonella* flagellin. Infect Immun 1991;59:2158–65.
[16] Newton SMC, Joys TM, Anderson SA, Kennedy RC, Hovi ME, Stocker BAD. Expression and immunogenicity of an 18-residue epitope of HIV1 gp41 inserted in the flagellar protein of a *Salmonella* live vaccine. Res Microbiol 1995;146:203–6.
[17] Verma NK, Ziegler HK, Stocker BAD, Schoolnik GK. Induction of a cellular immune response to a defined T-cell epitope as an insert in the flagellin of a live vaccine strain of *Salmonella*. Vaccine 1995;13:235–44.
[18] Adrian VSH. Pre-erytrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy. Nature 2006;6:21–32.
[19] Kumar KA, Sano GI, Boscardin S, Nussenzweig RS, Nussenzweig MC, Zavala F, et al. The circumsporozoite protein is an immunodominant protective antigen in irradiated sporozoites. Nature 2006;444:937–40.
[20] Weiss WR, Mellouk S, Houghten RA, Sedegah M, Kumar S, Good MF, et al. Cytotoxic T cells recognize a peptide from the circumsporozoite protein on malaria-infected hepatocytes. J Exp Med 1990;171:763–73.
[21] Malik A, Egan JE, Houghten RA, Sadoff JC, Hoffman SL. Human cytotoxic T lymphocytes against the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:3300–4.
[22] Rodrigues MM, Cordey AS, Arraeza G, Corradin G, Romero P, Maryanski JL, et al. CD8+ cytolytic T cell clones derived against the *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein protect against malaria. Int Immunol 1991;3:579–85.
[23] Aggarwal A, Kumar S, Jaffe R, Hone D, Gross M, Sadoff J. Oral *Salmonella*: malaria circunsporozoito recombinants induce specific CD8+ cytotoxic T cells. J Exp Med 1990;172:1083–90.
[24] Chinchilla M, Pasetti MF, Medina-Moreno SM, Wang JY, Gomez-Duarte OG, Stout R, et al. Enhanced immunity to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein (PfCSP) by using *Salmonella enterica* Serovar Typhi expressing PfCSP and a PfCSP-encoding DNA vaccine in a heterologous prime-boost strategy. Infect Immun 2007;75:3769–79.
[25] Sadoff JC, Ballou WR, Baron LS, Majarian WR, Brey RN, Hockmeyer WT, et al. Oral *Salmonella typhimurium* vaccine expressing circumsporozoite protein protects against malaria. Science 1988;240:336–8.
[26] Braga CJM, Massis LM, Alencar BCG, Rodrigues MM, Sbrogio-Almeida ME, Ferreira LCS, et al. T cell adjuvant effects of three *Salmonella enterica* flagellins. Braz J Microbiol 2008;39:44–9.
[27] Sbrogio-Almeida ME, Mosca T, Massis LM, Abrahamsohn IA, Ferreira LCS. Host and bacterial factors affecting induction of immune responses to flagellin expressed by attenuated *Salmonella* vaccine strains. Infect Immun 2004;72:2546–55.
[28] Sanders CJ, Yu Y, MooreII DA, Williams IR, Gewert AT. Humoral immune response to flagelin requires T cells and activation of innate immunity. J Immunol 2006;177:2810–8.
[29] Heppner DG, Schewenk RJ, Arnot D, Sauerwein RWA, Luty JF. The dog that did not bark: malaria vaccines without antibodies. Trends Parasitol 2007;23:293–6.
[30] Lasaro MO, Luiz WB, Sbrogio-Almeida ME, Nishimura LS, Guth BEC, Ferreira LCS. Combined vaccine regimen based on parenteral priming with a DNA vaccine and administration of an oral booster consisting of a recombinant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium vaccine strain for immunization

against human-derived enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Infect Immun 2004;72:6480–91.

[31] Lasaro MO, Luiz WB, Sbrogio-Almeida ME, Ferreira LCS. Prime-boost vaccine regimen confers protective immunity to human-derived enterotoxigenic *Escherichia coli*. Vaccine 2005;23:2430–8.

[32] Jackson DC, Purcell AW, Fiszmaurice CJ, Zeng W, Hart DN. The central role played by peptides in the immune response and the design of peptide-based vaccines against infectious diseases and cancer. Curr Drug Targets 2002;3:175–96.

[33] Snyder JE, Bowers WJ, Livingstone AM, Lee FE, Federoff HJ, Mosmann TR. Measuring the frequency of mouse and human cytotoxic T cells by the Lysispot assay: independent regulation of cytokine secretion and short-term killing. Nat Med 2003;9:231–5.

[34] Sanders CJ, Franchi L, Yarovinsky F, Uematsu S, Akira S, Núnez G, et al. Induction of adaptive immunity by flagellin does not require robust activation of innate immunity. Eur J Immunol 2009;39:359–71.

[35] Bargieri DY, Daniela Rosa DS, Braga CJM, Costa FTM, Soares IS, Ferreira LCS, et al. New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella Typhimurium* FliC flagellin. Vaccine 2008;26:6132–42.

[36] Bates JT, Uematsu S, Akira S, Mizel SB. Direct stimulation of *tl*r5^{+}/CD11c^{+} cells is necessary for the adjuvant activity of flagellin. J Immunol 2009;182:7539–47.

[37] Newton SM, Jacob CO, Stocker BA. Immune response to cholera toxin epitope inserted in Salmonella flagellin. Science 1989;244:70–2.