CAROLINA SALCEDO RIVILLAS

**Caracterização dos efeitos imunomoduladores e
adjuvanticidade da flagelina Hag de *Bacillus subtilis***

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Ciências.

São Paulo
2012

CAROLINA SALCEDO RIVILLAS

**Caracterização dos efeitos imunomoduladores e
adjuvanticidade da flagelina Hag de *Bacillus subtilis***

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza
Ferreira

Versão corrigida. Versão original eletrônica
encontra-se disponível tanto na Biblioteca do
ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2012

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

Salcedo Rivillas, Carolina.

Caracterização dos efeitos imunomoduladores e adjuvanticidade da flagelina Hag de *Bacillus subtilis* / Carolina Salcedo Rivillas. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – 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: Characterization of immunomodulatory and adjuvant effects of *Bacillus subtilis* flagellin.

1. Vacinas 2. *Bacillus* gram positivos 3. Adjuvantes 4. Sistema imune inato e adaptativo 5. Citocinas 6. Anticorpos I. Ferreira, Prof. Dr. Luis Carlos de Souza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB041/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Carolina Salcedo Rivillas.

Título da Dissertação: Caracterização dos efeitos imunomoduladores e adjuvantividade da flagelina Hag de *Bacillus subtilis*.

Orientador(a): Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
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 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **45** nas fls. **86** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Luis Carlos de Souza Ferreira, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Caracterização dos efeitos imunomoduladores e adjuvantividade da flagelina Hag de Bacillus subtilis** do qual participou(aram) o(s) **Catarina Joelma Braga, Aline Florêncio Teixeira, Carolina Salcedo Rivillas e a pesquisadora Maria Elisabete Sbrogio de Almeida**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **03.05.2010**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 03 de maio de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

À Deus, que tudo posso naquele que me fortalece, e à minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, por estar sempre presente e disposto a me escutar e aconselhar com o único propósito de melhorar. Por me acompanhar nesta fase da minha vida profissional estruturando bases que, com certeza, serão fundamentais para alcançar os meus objetivos futuros, de coração, muito obrigada!.

À família que foi, é e será sempre o meu motor, meu alicerce para afrontar as dificuldades pensando sempre num melhor futuro desfrutando da sua companhia. Apesar da distância, sempre estão no meu coração, principalmente Cielo, minha mãe, amo vocês!.

À Catarina Joelma Magalhães Braga, por ter me acompanhado e ajudado no início do meu mestrado e por ter me ensinado aspectos fundamentais e importantes na minha vida tanto profissional como pessoal, obrigada!.

À Dra. María Elizabete Sbrogio de Almedia porque sua presença é sinônimo de amor; pelo tempo dedicado às nossas discussões, pela ajuda e sempre boa disposição. Sempre estará no meu coração.

À Dra. Rita de Cássia Café, pela boa disposição para escutar sempre os alunos e por sempre se preocupar pela organização do laboratório.

À Loren Cristina da Silva, por sempre ter escutado de você palavras positivas e de motivação, pela pessoa doce, sincera e especial que você é e por sempre ajudar a todos nós no laboratório com tão boa vontade.

À Aline Teixeira Florêncio, minha amiga, minha irmã brasileira, você foi e tem sido muito importante para mim por me escutar quando mais o precisei, por estar sempre comigo de uma maneira tão incondicional, por compartilhar e proporcionar momentos de descontração, como já lhe disse muitas vezes, você é uma pessoa muito especial e só tenho a te agradecer. Graças a Deus posso contar com amigas como você.

À Priscila Aparecida Dal Pozo Gomez, pela sua valiosa ajuda na sangria de tantos animais e muitos conselhos profissionais recebidos; pelas nossas conversas engraçadas, por compartilhar vários momentos tanto de tensão quanto de descontração e pelas muitas caronas para os diferentes eventos.

Ao Roberto Nepomuceno pela sempre boa disposição para ajudar, por me ouvir e discutir assuntos profissionais ou da vida. Por todos os conselhos recebidos, pela compreensão e pelos vários momentos compartilhados.

À Debora Santos, por sempre discutirmos assuntos profissionais, por ser minha colega de sala e ser a voz representante na sala; pelas nossas diversas conversas nas que com sua simpatia me fez dar muitas rizadas, pela sinceridade, você é uma ótima pessoa e sempre será a minha amiga.

À Raíza de Sales Pereira Bizerra, que foi minha colega de quarto, é minha amiga e minha segunda irmã brasileira, pelas nossas conversas que tiraram muitas horas de sono, pelos agradáveis momentos e pelas lindas palavras de apoio e força que sempre escutei, dou graças a Deus porque colocou você no meu caminho.

Ao Jaime Henrique, pelas nossas diversas conversas profissionais que foram muito importantes que contribuíram positivamente nesse trabalho, pela sempre boa disposição para ajudar e discutir os assuntos sempre com visão e pensamento tão crítico e pelos vários momentos compartilhados.

Ao Rafael Ciro, que com sua paciência sempre me ajudou incondicionalmente, pelos muitos conselhos profissionais recebidos e pelo seu jeito tranquilo que faz dos momentos difíceis mais leves.

Ao Francisco Cariri, pela sempre boa vontade e o sorriso que estão sempre com você, pela ajuda incondicional em todo momento, pelos momentos de descontração compartilhados com todos os colegas.

Ao Eduardo Gimenez, por ser sempre uma pessoa muito gentil, pela sua disposição para ajudar sempre com boa vontade e pelo bom desenvolvimento profissional; pelos vários momentos compartilhados e pelas muitas conversas engraçadas, tenho muito a te agradecer.

À Renata Damásio, pelas nossas conversas profissionais e pessoais, bons conselhos e, sobre tudo, por me escutar sempre. Você é uma pessoa muito especial e estará sempre no meu coração, obrigada!.

À Milene Batista, pela sempre boa vontade e disposição para discutir diversos assuntos tanto profissionais como da vida, pelos bons conselhos e bom acolhimento.

À Denicar Lina, pelo jeito dócil e agradável, pelas nossas conversas e ajudas sempre com muita boa vontade. Por passar sempre às pessoas muita calma e tranquilidade, Deus te bençoe sempre!.

À Juliana Falcão, Mariana Diníz e Wilson por sempre estarem tão interessados pela organização e integração do pessoal do laboratório, por sempre estarem presentes e dispostos a ajudarem em qualquer situação seja profissional ou pessoal.

À Bruna Maldonado, Camila Mathias, Luana, Mônica Rodriguez, Naína, Caroline Casaroli por serem pessoas tão dedicadas aos seus trabalhos, pela boa disposição para ajudar e sempre com muita boa vontade e pelos conselhos recebidos.

Ao Luis Ernesto, pelos muitos conselhos e discussões profissionais que, sem dúvida, contribuíram positivamente no desenvolvimento desse trabalho.

À Juliane Afonso, Sandra Regina e ao Luis do Biotério do Departamento de parasitologia do ICB II, pelo bom trabalho desenvolvido, pela dedicação e pela responsabilidade com os animais.

Aos secretários do Departamento de Microbiologia e da Pós-Graduação, Alice Shimabuku, Bruno, Ana Maria Amaral e Naíde Farripas pela ajuda e colaboração em todo momento do meu mestrado, obrigada!.

Aos seguranças do ICB II, por sempre estarem presentes quando preciso, por estar sempre atentos e dispostos a ajudar gentilmente.

Aos funcionários do serviço de Biblioteca do ICB, pelo trabalho com tanta dedicação e sempre de forma eficiente, por sempre me fornecer a ajuda e orientações necessárias de forma tão gentil.

Ao apoio financeiro da CAPES, CNPq, e FAPESP, pelo auxílio à pesquisa, possibilitando a realização desse trabalho.

Agradeço a todos os que de uma ou outra forma contribuíram na realização desse trabalho.

Agradeço acima de tudo a Deus, por ter me acompanhado em essa etapa da minha vida, por ter segurado minha mão quando eu mais precisei e ter me dado força para continuar depois de muitas quedas, sem ele nada disto teria sido possível.

**La paz exige cuatro condiciones
esenciales: Verdad, justicia, amor y
libertad.**

Juan Pablo II

Resumo

RIVILLAS CS Caracterização dos efeitos imunomoduladores e adjuvanticidade da flagelina Hag de *Bacillus subtilis*. [Dissertação (Mestrado em Microbiologia)] - São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2012.

Flagelinas bacterianas, particularmente aquelas derivadas de bactérias gram-negativas, ativam o sistema imune inato e promovem reações inflamatórias que resultam em efeitos adjuvantes para antígenos co-administrados. No entanto, não existem informações disponíveis sobre as propriedades biológicas e imunológicas de flagelinas produzida por algumas bactérias gram-positivas, como *Bacillus subtilis*, desprovidos de endotoxina em seu envoltório celular. O presente projeto de mestrado teve como objetivo estudar os efeitos adjuvantes e imunomoduladores da flagelina Hag de *B. subtilis*. O trabalho envolveu a purificação da flagelina e subsequente avaliação de suas propriedades inflamatórias *in vitro* (cultura de células) e *in vivo* (inoculação em camundongos). Formulações vacinais baseadas em flagelina purificada e ovalbumina (OVA) foram administradas pelas vias intra-nasal (i.n.) ou subcutânea (s.c.) em camundongos Balb/C e C57BL/6 para posterior monitoramento de linfócitos B e T por meio da produção de anticorpos, citocinas e/ou expressão de marcadores de superfície. Os resultados obtidos demonstraram a imunogenicidade e propriedades imunomoduladoras da flagelina de *B. subtilis* em camundongos das linhagens Balb/C e C57BL/6 em relação à indução de anticorpos antígeno-específicos. Não foi possível demonstrar a ativação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ antígenos-específicos em animais Balb/C imunizados com OVA e Hag tanto pela via s.c. como pela via i.n. Resultados mais promissores em relação aos efeitos adjuvantes frente a células T foram encontrados em animais C57BL/6, mas experimentos adicionais devem ser feitos para melhor caracterizar o efeito. Os resultados obtidos abrem perspectivas para o estudo do potencial da flagelina Hag de *B. subtilis* como adjuvante vacinal.

Palavras-chave: Vacinas. *B. subtilis*. Flagelina. Adjuvantes. Sistema imune inato e adaptativo. Citocinas. Anticorpos.

Abstract

RIVILLAS CS Characterization of immunomodulatory and adjuvant effects of *Bacillus subtilis* flagellin. [Master thesis (Microbiology)] – São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2012.

Bacterial flagellin, particularly those derived from gram negatives bacteria, activates the innate immune system and promotes inflammatory reactions resulting in adjuvants effects against coadministrated antigens. However, there is not information about biological and immunological properties of flagellins produced by gram positives bacteria, such as *Bacillus subtilis*, devoid of endotoxin in their envelope. This study aimed the evaluation of immunomodulator and adjuvant effects of Hag flagellin from *B. subtilis* and theirs inflammatory properties *in vitro* (culture cells) and *in vivo* (mice immunization). Vaccine formulations based in purified flagellin and Ovalbumine protein (OVA) were administrated intranasal (i.n.) and subcutaneously (s.c.) in Balb/C and C57BL/6 mice and then the population of B and T lymphocytes were monitored for production of antibodies and citocines and/or surface markers expression. Results showed the immunogenicity and immunomodulatory properties of *B. subtilis* flagellin in mice of Balb/C and C57BL/6 lineages regarding the induction of antigen specific antibodies. It was not possible to demonstrate the activation of T CD4⁺ and T CD8⁺ lymphocytes antigen specific in immunized Balb/C mice with OVA and Hag by i.n. and s.c. via. Most promising results concerning the adjuvant effects observed on T cells activation were found in C57BL/6 mice, but additional experiments should be conducted to a better effect characterization. The results obtained open future perspectives for the study of the potential use of *B. subtilis* Hag flagellin as adjuvant in vaccines.

Keywords: Vaccine. *B. subtilis*. Flagellin. Adjuvants. Innate and adaptive immune system. Citocines. Antibodies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Expressão de flagelina Hag em linhagens de <i>B. subtilis</i> . _____	41
Figura 2 - Extração e identificação da proteína Hag na linhagem WB800 de <i>B. subtilis</i> . _____	41
Figura 3 - Curva de crescimento da linhagem <i>B. subtilis</i> WB800. _____	42
Figura 4 - Influência do estágio de crescimento sobre a extração da proteína Hag de <i>B. subtilis</i> . _____	43
Figura 5 - Efeito da homogeneização sobre a extração da proteína Hag de <i>B. subtilis</i> . _____	44
Figura 6 - Influência do volume de cultura sobre a pureza da proteína Hag extraída da linhagem WB800 de <i>B. subtilis</i> . _____	45
Figura 7 - Atividade biológica da proteína Hag de <i>B. subtilis</i> . _____	47
Figura 8 - Atividade biológica da flagelina Hag de <i>B. subtilis</i> . _____	48
Figura 9 - Regime vacinal e coleta de sangue nos animais imunizados. ____	49
Figura 10 - Detecção por Elisa de anticorpos IgG séricos específicos para Hag em animais submetidos a diferentes regimes vacinais. _____	50
Figura 11 - Detecção de subclasses de IgG1 e IgG2a séricos para anticorpos anti-Hag induzidos em animais submetidos a diferentes regimes vacinais. _____	51
Figura 12 - Detecção por Elisa de anticorpos IgG séricos específicos para OVA em animais submetidos a diferentes regimes vacinais. _____	52
Figura 13 - Detecção de subclasses de IgG1 e IgG2a séricos para anticorpos anti-OVA induzidos em animais Balb/C submetidos a diferentes regimes vacinais. _____	54

Figura 14 -Dosagem de IFN- γ produzido por células do baço derivadas de camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais. _____	56
Figura 15 -Dosagem de IL-4 produzido por células do baço derivadas de camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais. _____	57
Figura 16 - Dosagem de IL-10 produzido por células do baço derivadas de camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais. _____	58
Figura 17 - Efeito adjuvante da Hag sobre a resposta de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ específicos para a OVA nos animais que foram imunizados pela via s.c. _____	60
Figura 18 - Efeito adjuvante da Hag sobre a resposta de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ específicos para a OVA nos animais imunizados pela via i.n. _____	61
Figura 19 - Detecção por Elisa de anticorpos IgG séricos específicos para OVA em animais após cada dose dada dos diferentes regimes vacinais. ____	63
Figura 20 -Detecção de IgG total e as subclasses IgG1 e IgG2c séricos para anticorpos anti-OVA induzidos em animais submetidos a diferentes regimes vacinais. _____	65
Figura 21 - Efeito adjuvante de duas flagelinas sobre a resposta de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ específicos contra OVA nos animais imunizados pelas vias s.c. e i.n. _____	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens bacterianas utilizadas no presente estudo. _____	32
Tabela 2 - Linhagens celulares utilizadas no presente estudo. _____	32
Tabela 3 - Rendimento da proteína Hag após procedimento de extração com a linhagem WB800 de <i>B. subtilis</i> . _____	45
Tabela 4 - Quantificação do LPS contaminante em amostras de Hag submetidos ao tratamento com Triton X-114. _____	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ACK	-	Solução para lise de hemácias
ANOVA-		Análise de variância
APC	-	Células apresentadoras de antígeno
BSA	-	Albumina do soro bovino
CARD	-	Domínio de recrutamento e ativação da caspase
CFA	-	Adjuvante Completo de Freund
COX-2	-	Ciclooxigenase 2
DAB	-	Diaminobenzidina
DMEM	-	Meio Dulbecco modificado
D0	-	Domínio conservado das flagelinas 0
D1	-	Domínio conservado das flagelinas 1
D2	-	Domínio hipervariável das flagelinas 2
D3	-	Domínio hipervariável das flagelinas 3
D.O.	-	Densidade óptica
EDTA	-	Ácido etilenodiamino tetra acético
ELISA	-	Ensaio imunossorbente ligado à enzima
ELISPOT		Enzyme-linked immunosorbent spot
EU	-	Unidade endotóxica
FCTT	-	Porção atóxica da toxina do tétano
FliCd	-	Flagelina tipo d
FliCi	-	Flagelina tipo i
FliB	-	Flagelina tipo B
GM-CSF-		Fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos

gp43	-	Glicoproteína de 43 kDa
GRAS	-	Generally Regarded As Safe
h	-	Hora
ICAM	-	Molécula de adesão intercelular
ICS	-	Marcação intracelular
IFN-γ	-	Interferon gama
IgG	-	Imunoglobulina G total
IgG 1	-	Imunoglobulina G 1
IgG 2a	-	Imunoglobulina G 2a
IgG 2c	-	Imunoglobulina G 2c
IL-4	-	Interleucina 4
IL-5	-	Interleucina 5
IL-6	-	Interleucina 6
IL-8	-	Interleucina 8
IL-10	-	Interleucina 10
IL-12	-	Interleucina 12
IL-1β	-	Interleucina 1 beta
i.n.	-	Intranasal
iNOS	-	Óxido nítrico sintase induzível
i.p.	-	Intraperitoneal
Ipaf	-	Receptor citosólico do tipo NOD
kDa	-	Quilodalton
L	-	Litro
LAL	-	Lisado de Amebócito de Limulus
LB	-	Luria Bertani

LLO	-	Listeriolisina O
LRR	-	Domínio rico em repetições de leucina
LPS	-	Lipopolissacarídeo
LTα	-	Leucotrieno alfa
LTβ	-	Leucotrieno beta
MHC I	-	Complexo principal de histocompatibilidade I
MHC II	-	Complexo principal de histocompatibilidade II
mA	-	Miliamperio
mg	-	Miligrama
min	-	Minutos
mL	-	Mililitro
mM	-	Milimolar
MyD88	-	Fator de diferenciação mielóide
NF-kB	-	Fator Nuclear – Kapa B
NLR	-	Receptores do tipo NOD
nm	-	Nanometro
ON	-	Óxido nítrico
OPD	-	O-Fenilenodiaminadihidrocloreto
OVA	-	Ovalbumina
PAMP	-	Modelos moleculares associados a patógenos
PBS-T	-	Tampão salina fosfato mais 0,5% de tween 20
PE	-	Ficoeritrina
pg	-	picograma
PRR	-	Receptores de reconhecimento padrão
PSA	-	Persulfato de amônia

PVF	-	Proteína verde fluorescente
PYD	-	Domínio pirina
q.s.p.	-	Quantidade suficiente para
RPMI	-	Meio Roswell Park Memorial Institute
s.c.	-	Subcutânea
SDS-PAGE-		Duodecil sulfato de sódio eletroforese em gel de poliacrilamida
SFB	-	Soro fetal bovino
TEMED	-	Tetrametiletilenediamina
Th1	-	Linfócito T auxiliar 1
Th2	-	Linfócito T auxiliar 2
TLR	-	Receptor do tipo Toll
TNF-α	-	Fator de Necrose Tumoral alfa
VCAM	-	Molécula de adesão de célula vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Meios de cultura	29
3.2 Tampões soluções e outros reagentes	29
3.2.1 Soluções para eletroforese de proteínas (SDS PAGE)	29
3.2.2 Soluções para coloração do gel	30
3.2.3 Soluções para imunodeteção em membrana de nitrocelulose (Immunoblot)	30
3.2.4 Solução utilizada nos ensaios de ELISA	31
3.2.5 solução utilizada nos ensaios celulares	31
3.2.6 Solução Salina Fosfato (PBS) 10X	32
3.2.7 Solução PBS IX	32
3.3 Linhagens	32
3.4 Anticorpos e outros reagentes biológicos	33
3.5 Caracterização da expressão de flagelina Hag pela linhagem B. subtilis WB800	33
3.5.1 Preparação da flagelina purificada	33
3.5.2 Detecção e remoção de purificação de LPS	34
3.5.3 Imunodeteção em filtro de nitrocelulosae (Western blot)	34
3.6 Caracterização da atividade biológica da flagelina Hag	35
3.6.1 Produção in vitro de interleucina 8 (IL-8)	35
3.6.2 Produção in vivo de interleucina 6 (IL-6)	35
3.7 Estudos imunológicos	36

3.7.1	Animais	36
3.7.2	Protocolos de Imunização	36
3.7.2.1	<i>Antígeno e adjuvantes utilizados nas imunizações</i>	36
3.7.3	Deteção de anticorpos e ensaios celulares	37
3.7.3.1	<i>ELISA</i>	37
3.7.3.2	<i>Intracellular Cytokine Staining (ICS)</i>	37
3.7.3.3	<i>ELISPOT (Enzyme-linked immunosorbent spot)</i>	38
3.7.3.4	<i>ELISA de citocinas</i>	38
3.8	Análise estatística	39
4	RESULTADOS	40
4.1	Extração e purificação da flagelina Hag de <i>B. subtilis</i>	40
4.2	Avaliação da funcionalidade da proteína Hag de <i>B. subtilis</i>	47
4.3	Avaliação das propriedades imunológicas e adjuvantes da flagelina Hag de <i>B. subtilis</i>	49
5	DISCUSSÃO	68
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	77
	REFERÊNCIAS	78

1 Introdução

Vacinas podem ser constituídas por patógenos inativados ou frações deles e vão desde microrganismos inativados ou atenuados até toxóides, polissacarídeos e proteínas recombinantes (Johnson *et al.*, 1986 and McBEAN *et al.*, 1988). Tais vacinais têm como principal característica a baixa imunogenicidade, especialmente aquelas constituídas por proteínas recombinantes purificadas (Coffman *et al.*, 2010). Como estratégia para contornar tal problema, os adjuvantes são empregados como “potencializadores imunológicos” (O’Hagan *et al.*, 2003 and Pashine *et al.*, 2005). Esses potencializadores são compostos que, quando administrados junto ao antígeno vacinal, podem alterar qualitativamente e quantitativamente a resposta imune induzida direcionando-a ao padrão necessário à proteção e à longevidade da resposta imunológica (Pino *et al.*, 2005, Malherbe *et al.*, 2008, Galli *et al.*, 2009 and Kasturi *et al.*, 2011).

O sistema imunológico está dividido em dois componentes. O primeiro é o sistema imune inato, conhecido por ser a primeira linha de defesa contra os microrganismos causadores de infecções, além de ser o modulador das respostas mediadas pelo o sistema imune adaptativo, o segundo componente do sistema imunológico dos mamíferos. A imunidade adaptativa confere resistência específica a uma grande variedade de antígenos, na qual linfócitos B e T reconhecem epitopos em antígenos exógenos por meio da apresentação mediada por células apresentadoras de antígenos (APCs) (Schijn, 2001). Na resposta imune inata, células como neutrófilos, macrófagos, precursores de células dendríticas, células endoteliais e epiteliais desencadeiam uma série de reações na presença de moléculas específicas, denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) (Akira *et al.*, 2001, Cuadros *et al.*, 2004 and Honko *et al.*, 2005). A ativação dessas células resulta no aumento da expressão de diversas moléculas de superfície, como o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e moléculas co-estimuladoras assim como a secreção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (Aderem *et al.*, 2000 and Janssens *et al.*, 2003). Os receptores para os PAMP, denominados PRRs, constituem famílias de proteínas que compartilham determinadas características e funções e são responsáveis por certo grau

de especificidade dessas interações (Janeway *et al.*, 2002 and Akira, 2003). Entre as famílias de PRRs destacam-se os receptores Toll-like (TLRs) e os NOD-like (NLRs) (Nucleotide binding and Oligomerization Domain), elementos centrais no desencadeamento de mecanismos efetores inatos e ativação da imunidade adaptativa (Aderem *et al.* 2000 and Franchi *et al.*, 2009).

Os membros da família TLR são expressos diferencialmente por células do sistema imunológico responsáveis pelo reconhecimento dos PAMPs. Até o momento, foram descobertos 13 TLRs em mamíferos, sendo 10 deles encontrados em humanos e 13 em murinos (TLR1-13) (Beutler, 2004). Cada membro da família possui uma região de repetições rica em leucina (LRR) e um domínio citoplásmico, chamado domínio Toll/IL-1R ou domínio TIR. Os eventos de tradução de sinais mediada por TLR e pelas inúmeras moléculas adaptadoras começam com a união de um PAMP ao TLR, que consequentemente ativa o domínio TIR, formando um complexo de sinalização com o fator de diferenciação mielóide (MyD88), uma proteína adaptadora citoplasmática, IRAK, e um fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6), seguido pela ativação do fator nuclear de transcrição (NF- κ B) e da cascata de mitogen-activated protein kinase (MAPK). Uma vez ativado o NF- κ B, é deslocado para o núcleo da célula, promovendo a maturação de APCs, a expressão de moléculas de MHC, genes de citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , LT α , LT β e GM-CSF), moléculas de adesão (ICAM, VCAM) e enzimas induzíveis (iNOS e COX-2) (Honko *et al.*, 2005).

A família de receptores NOD-like (NLRs), também conhecidos como NATCH, Nod-LRR ou CATERPILLER, é representada por 23 membros (Franchi *et al.*, 2006) e são encontrados no citoplasma das células formando um complexo multiprotéico conhecido como “Inflamassoma”, regulando a imunidade inata em resposta ao reconhecimento de produtos bacterianos no citossol (Inohara *et al.*, 2001). Os componentes moleculares desse sistema apresentam na região carboxil-terminal um domínio LRR, presente também nos TLRs, responsável pelo reconhecimento do ligante. Na região central ou intermediária é encontrado o domínio NOD que medeia a oligomerização dos elementos após ativação. Por fim, na porção amino-terminal é encontrado o domínio efetor que ativa a caspase-1 e o domínio de recrutamento (CARD) ou domínio Pyrina (PYD), levando assim a uma

resposta inflamatória por meio da ativação da Caspase-1 e IL-1 β pela via do inflamassoma (Miao *et al.*, 2006 and Franchi *et al.*, 2009).

Em relação aos ativadores do sistema TLR, foi descoberto que o peptidoglicano é reconhecido pelo TLR2, o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) pelo TLR4, RNA fita simples pelo TLR8 e assim outros componentes de natureza microbiana ou mesmo elementos do próprio metabolismo liberados em situação de estresse (Akira, 2003). No entanto, hoje sabemos que alguns compostos podem ativar sistema imunológico inato por meios diferentes. Por exemplo, Moors e colaboradores (2001) descreveram a interação de flagelinas bacterianas ao TLR5, fenômeno confirmado também por Hayashi e colaboradores (2001) e por Mizel (2003). Andersen-Nissen e colaboradores (2005) complementam essas observações ao demonstrarem que o TLR5 é ativado por flagelinas de uma grande variedade de bactérias, com exceção de dois clados de bactérias flageladas que possuem uma sequência pouco usual, incluindo *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* e *Bartonella bacilliformis*. Por outro lado, a deleção do TLR5 não altera a produção de anticorpos antígeno específicos induzidos na presença de flagelina sugerindo que esse não depende do TLR5 (Gavin *et al.*, 2006). De fato, estudos posteriores demonstraram que outros receptores intracelulares, como o NLRC4 (Ipaf), estão envolvidos nas propriedades imunomoduladoras de flagelinas (Sanders *et al.*, 2009). Esses dados demonstram que duas famílias de receptores (TLRs e NLRs) ativam diferentes vias bioquímicas e podem atuar independentemente ou em cooperação na ativação do sistema imune inato e, conseqüentemente, a montagem de respostas relativas ao sistema imune adaptativo. Tal duplicidade de reconhecimento aumenta a diversidade dos mecanismos de resistência a patógenos e determina o tipo de resposta a ser desencadeada (Buzzo *et al.*, 2010, Vijay-Kumar *et al.*, 2010 and Letran *et al.*, 2011). Essas observações indicam que, em particular, flagelinas bacterianas podem ser bons candidatos a “potencializadores” de resposta imune em função da multiplicidade de receptores que levam à ativação do sistema imune inato.

A flagelina é o principal componente do flagelo bacteriano, uma estrutura complexa presente na superfície da bactéria e responsável pela mobilidade, quimiotaxia e adesão da mesma às células do hospedeiro (Macnab, 2003). Cerca de 20.000 monômeros de flagelina se autopolimerizam para formar um tubo oco denominado

filamento flagelar, que funciona como um propulsor mecânico. O filamento encontra-se ligado ao gancho (uma haste flexível) que, por sua vez, está conectado ao corpo basal, estrutura responsável pela fixação do flagelo à membrana e à parede celular da bactéria (Newton & Stocker, 1991, Murthy *et al.*, 2004 and Cunningham *et al.*, 2004). Dependendo da espécie bacteriana, a flagelina pode ter massa molecular que varia de 28 a 80 kDa (Winstanley *et al.*, 1997). O alinhamento das sequências de aminoácidos de flagelinas de diferentes espécies demonstrou que as regiões N e C terminais são conservadas, mas flanqueadas por uma região central variável tanto na composição de resíduos de aminoácidos quanto em extensão. (Newton *et al.*, 1989, Wei *et al.*, 1985, Yonekura *et al.*, 2003 and Ramos *et al.*, 2004).

A molécula de flagelina tem estrutura similar a um bumerangue, sendo formada por 4 domínios: os domínios D0 e D1, formados pelas regiões N- e C- terminal, na forma de estrutura alfa-hélice; e os domínios D2 e D3, formados pela região central, posicionada na periferia do filamento onde encontram-se a maioria dos epítomos B-dependentes, importantes na sorotipagem de muitas espécies bacterianas, e presente na forma de estrutura em folha β -pregueada. (Flynn *et al.*, 1990; Yonekura *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2004 and Murthy *et al.*, 2004). Os domínios D0 e D1 estão localizados na porção interna do filamento flagelar e são necessários para a polimerização, montagem do filamento e função de mobilidade. Essas características dos domínios D0 e D1 explicam porque essas regiões da molécula são altamente conservadas nas diversas espécies bacterianas flageladas e o seu reconhecimento por ligantes do sistema imune inato, sendo que pelo menos uma sequência localizada no domínio D0 é reconhecida por NLRs e uma porção do domínio D1 é reconhecida pelo TLR5. (Lightfield *et al.*, 2008).

Dentre as inúmeras flagelinas, as de *Salmonella* foram extensivamente estudadas como adjuvantes. Luna e colaboradores (1997) fusionaram à flagelina de *Salmonella* peptídeos correspondentes a 4 regiões do antígeno fator de colonização I de *E. coli* (CFA/I), relacionados à adesão da bactéria ao epitélio intestinal. Camundongos imunizados pela via intraperitoneal com flagelinas híbridas purificadas desenvolveram anticorpos capazes de reconhecer a fímbria. Cuadros e colaboradores (2004), avaliaram a capacidade da flagelina FljB, expressa por *S. Typhimurium*, para induzir respostas celulares. Nesse trabalho, a proteína verde fluorescente (PVF) foi fusionada à porção C-

terminal da flagelina. A imunização de animais, pela via subcutânea, com a proteína híbrida (FliB-PVF) foi capaz de promover a ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas para epítomos da proteína PVF. Em outro estudo, o efeito adjuvante da flagelina para ativação de respostas celulares foi pesquisado após a fusão da ovalbumina (OVA) com a flagelina FliB (Huleatt *et al.*, 2007). Os resultados mostraram que a proteína de fusão foi capaz de ativar células T CD8⁺ específicas para OVA. O grupo pesquisou ainda a ativação de células T CD8⁺ específicas para epítomos contidos em duas proteínas da *Listeria monocytogenes*. Um fragmento de 235 aminoácidos da listeriolisina O (LLO) e um fragmento de 123 aminoácidos da p60 foram fusionados na flagelina FliB. Os animais imunizados com essa proteína híbrida demonstraram significativa resposta de células T CD8⁺ antígeno específica e proteção após desafio com uma linhagem virulenta de *L. monocytogenes*. Pesquisas desenvolvidas pelo grupo do pesquisador McSorley (2002) demonstraram o potencial da flagelina para ativação de células T CD4⁺, específicas ao antígeno coadministrado, sem a necessidade de fusão à flagelina. Nesse trabalho, animais foram imunizados com o peptídeo T CD4⁺ restrito OVA₃₂₃₋₃₃₉ na ausência ou presença de flagelina FliCi. Os resultados revelaram que a ativação e expansão de células T CD4⁺ específicas foi cerca de 3-10 vezes superior nos animais que receberam a formulação contendo flagelina.

O Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas da Universidade de São Paulo tem se destacado por pesquisas voltadas ao uso de flagelinas de *Salmonella* como adjuvantes vacinais. Alguns exemplos bem sucedidos no uso de flagelinas de *S. Typhimurium* (FliCi ou FliB) ou *S. Muenchen* (FliCd) foram obtidos com antígenos derivados de parasitos causadores de malária *Plasmodium vivax* (Bargiere *et al.* 2008), *P. falciparum* (Bargiere *et al.* 2010), e *P. yoelli* (Braga *et al.*, 2009). Resultados promissores também foram encontrados com um peptídeo sintético derivado da proteína gP43 do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, causador da paracoccidioidose micose (Braga *et al.*, 2009). A capacidade de flagelinas em ativar respostas imunológicas mediadas por linfócitos citotóxicos (T CD8⁺) também foram pesquisadas pelo grupo com resultados promissores obtidos com antígenos modelos, como a ovalbumina (Braga *et al.*, 2008).

Flagelinas de outras espécies de bactérias foram avaliadas como adjuvantes vacinais ou imunomoduladores. Lee e colaboradores (2006) testaram três concentrações

diferentes (1, 5 e 15 µg) da flagelina de *Vibrio vulnificus* (FlaB) em coadministração com uma porção atóxica da toxina do tétano (FCTT) em camundongos. Todos os animais foram protegidos a desafios com a toxina, enquanto os inoculados com apenas com o antígeno tiveram uma porcentagem de sobrevivência de 17%. Um estudo feito por Weimer e seus colaboradores (2009) avaliou o efeito de formulação vacinal contendo dois tipos de flagelina da *Pseudomonas aeruginosa* (tipos A e B) em coadministração ou fusão com proteínas da membrana externa de *P. aeruginosa* (OprI e OprF). Os resultados da imunização das flagelinas com as proteínas Opr resultou em altos títulos de produção da IgG específica para o antígeno, mas que não foram suficientes para promover a proteção completa a desafios com *P. aeruginosa*. Em 2007, Andersen-Nissen e colaboradores demonstraram que devido a uma mutação, que normalmente se apresenta no resíduo 268 do TLR5 humano e de camundongo, é possível a discriminação das diferentes moléculas de flagelinas, entre elas, a de *Listeria monocytogenes*, uma bactéria gram-positiva. Os resultados mostrados nesse trabalho demonstram que uma baixa concentração da flagelina de *L. monocytogenes* é suficiente para atingir a ativação do TLR5 tanto do em humanos como em camundongos, superando em potência à flagelina de *S. Typhimurium*, sugerindo, dessa forma, a viabilidade do uso de flagelinas derivadas de bactérias gram-positivas como adjuvantes vacinais. Também pode se encontrar na literatura relatos de trabalhos com flagelinas de *Escherichia coli* (Sanders *et al.*, 2006), *Legionella pneumophila* (Ren *et al.*, 2006; Molofsky *et al.*, 2006 and Lightfield *et al.*, 2008) e *P. aeruginosa* (Gewirtz *et al.*, 2001 and Zhang *et al.*, 2005).

Como demonstrado, até o momento existem relatos da utilização da flagelinas bacterianas, não derivadas de *Salmonella*, como adjuvantes vacinais. No entanto, não existem trabalhos que relatem as características imunomoduladoras da flagelina de bactérias gram-positivas do gênero *Bacillus*, particularmente *B. subtilis*, as quais apresentam algumas vantagens em relação àquelas extraídas de bactérias gram-negativas. A ausência de lipopolissacarídeo, ou endotoxina, simplifica drasticamente o processo de purificação e elimina o risco de contaminação de preparações purificadas com esse componente celular que, além de mascarar o efeito adjuvante inerente à flagelina, pode levar a reações inflamatórias exacerbadas.

A bactéria flagelada gram-positiva, *B. subtilis*, é considerada uma bactéria segura com status GRAS (generally regarded as safe) com aplicações na indústria, como produtora de enzimas, por apresentar efeito probiótico na forma de suspensão de esporos e no preparo de condimentos, como o Nato empregado na culinária oriental (Mazza, 1994; Green *et al.*, 1999; Cappola *et al.*, 2004 and Barnes *et al.*, 2007). Além disto, algumas linhagens geneticamente modificadas de *B. subtilis* foram empregadas com sucesso como veículos vacinais de administração oral ou parenteral em que antígenos de diferentes patógenos são expressos por células vegetativas ou esporos (Duc *et al.*, 2004; Paccez *et al.*, 2005; Paccez *et al.*, 2007 and Luiz *et al.*, 2008).

B. subtilis possui na sua superfície flagelos constituídos por unidades de flagelina que representa aproximadamente 98% da massa total dessas organelas. A proteína flagelar, que recebe o mesmo nome do gene que a codifica, Hag, tem um tamanho de 32,626 KDa (Sakamoto *et al.*, 1992), sendo constituída por 304 aminoácidos (La Vallie *et al.*, 1989). Dentre esses aminoácidos, destacam-se pelo alto conteúdo o ácido aspártico, ácido glutâmico e leucina (Simon *et al.*, 1977). A Hag preserva algumas das características básicas das flagelinas bacterianas, como as regiões extremos N- e C-terminal conservadas. Apesar disso, apenas um relato anterior avaliou superficialmente a capacidade da flagelina Hag de *B. subtilis* como imunomodulador (Andersen-Nissen *et al.*, 2007). Nesse estudo, foi demonstrado que Hag tem a propriedade de ligar o TLR5 de humanos e, em menor grau, o receptor de murinos, o que tornaria o uso dessa molécula como adjuvante vacinal particularmente atraente para uso em seres humanos.

No presente trabalho realizamos pesquisas voltadas para padronização do processo de extração da flagelina Hag de *B. subtilis* e a caracterização de suas propriedades adjuvantes e inflamatórias em modelo murino quando administrado por via parenteral e de mucosa.

2 Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar as propriedades adjuvantes e imunomoduladoras da flagelina Hag de *B. subtilis*. O trabalho está focado em duas análises principais:

- 1 - Obtenção da flagelina Hag em condições laboratoriais a partir de linhagens de *B. subtilis*.
- 2 - Determinação dos efeitos adjuvantes da flagelina Hag por meio da produção de anticorpos específicos e ativação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ usando como antígeno modelo a proteína ovalbumina coadministrada pelas vias intra-nasal (i.n) e subcutânea (s.c).

3 Materiais e Métodos

3.1 Meios de cultura

Para o cultivo das linhagens bacterianas foi usado rotineiramente o meio Luria-Bertani (LB). Quando necessário foi adicionado neomicina aos meios na concentração final de 25 µg/mL. O meio DMEM foi usado para manter as células HEK 293 e HEK 293/TLR5+ durante os ensaios de produção *in vitro* da interleucina 8. Foi preparado segundo recomendações do fabricante (SIGMA) e suplementado com penicilina (10 U.I./mL) e estreptomicina (10 µg/mL) (Cultilab). O meio DMEM foi enriquecido com 1% ou 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab), conforme a necessidade. O meio RPMI foi usado para lavar esplenócitos utilizados nos ensaios celulares. Foi preparado segundo recomendações do fabricante (SIGMA) e suplementado com penicilina (10 U.I./mL) e estreptomicina (10 µg/mL) (Cultilab). O meio RPMI foi enriquecido com 1% ou 10% de soro fetal bovino inativado (RPMI 1 ou 10%) (Cultilab), conforme a necessidade.

3.2 Tampões, soluções e outros reagentes

3.2.1 Soluções para eletroforese de proteínas (SDS PAGE)

- Tampão de amostra – 2% SDS
 - 4% 2-mercaptoetanol
 - 10% glicerol
 - 0,06 M Tris-HCl pH 6,8
 - 4 mM EDTA
 - Azul de bromofenol adicionado livremente

- Solução de persulfato de amônio (PSA) – 10% em água

- Gel de separação (12.5%) – para 2 géis : 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 2,0 mL

Acrilamida (30%)	3,12 mL
Água bidestilada	2,28 mL
SDS 10%	75 µL
PSA 10%	75 µL
TEMED	3 µL

- Gel de empilhamento (5%) – para 2 géis: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,44 mL

Acrilamida (5%)	0,580 mL
Água bidestilada	2,38 mL
SDS 10%	34 µL
PSA 10%	34 µL
TEMED	3,4 µL

3.2.2 Soluções para coloração do gel

0,25% Azul de Coomassie Blue R-250
 50% metanol
 10% ácido acético

Os géis foram descorados com água sob aquecimento.

3.2.3 Soluções para imunodeteção em membrana de nitrocelulose (Immunoblot)

Após a separação das proteínas por eletroforese. Essas foram transferidas para um filtro de nitrocelulose (Hybond-C Extra Amershan) em solução de transferência durante 1h com corrente aplicada de 30 mA.

- Tampão de transferência: 39 mM glicina

20% metanol
0,0375% SDS
48 mM Tris-HCl

- Solução para lavagem da membrana:
Tampão salina fosfato (PBS) adicionado de tween 20 a 0,05% (PBS-T)
- Solução para bloqueio e hibridização com o anticorpo:
5% de leite desnatado em PBS e 0,05% de tween 20 (Sigma)
- Solução de revelação por quimioluminescência para peroxidase:

O reagente de revelação (Kit ECL, Amersham) foi utilizado conforme especificações do fabricante. A solução foi preparada a partir de 500 µl do reagente 1 e 500 µl do reagente 2, misturados no momento do uso. A revelação foi feita em câmara escura e o filme exposto durante aproximadamente 30 minutos submetido à revelação com revelador fotográfico (GBX Kodak).

3.2.4 Solução utilizada nos ensaios de ELISA

- Solução para revelação do ELISA
12,5 mL tampão Citrato fosfato 33 mM, pH 5,5.
5 mg OPD (O-Fenilenodiaminadihidroclorato)
5 µL de H_2S_2

3.2.5 solução utilizada nos ensaios celulares

- Solução para lise de hemácias (ACK)
6,60 g NH_4Cl
0,80 g $KHCO_3$
0,03 g q.s.p. 1 L
A solução deve ser esterilizada antes do uso. Utilizar 1 mL por baço.
- Solução reveladora para peroxidase no ELISPOT
1 mg/mL de diaminobenzidina (DAB) – (Sigma)
1 µL/mL de H_2O_2
Tris-HCl 50 mM pH 7,5

3.2.6 Solução Salina Fosfato (PBS) 10X

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	18 g
KH ₂ PO ₄	3 g
Água destilada q.s.p.	1L
Ajustar o pH para 7,4	

3.2.7 Solução PBS 1X

PBS 10X	100 mL
Água q.s.p.	1L

3.3 Linhagens

Tabela 1 - Linhagens bacterianas usadas no presente estudo

Linhagens	Mutação proteases	Referência
<i>Bacillus subtilis</i> 1012		Saito <i>et al.</i> , 1979
<i>Bacillus subtilis</i> WB800	<i>nprE</i> ; <i>nprB</i> ; <i>aprE</i> ; <i>epr</i> ; <i>mpr</i> ; <i>bpf</i> ; <i>vpr</i> ; <i>wpr</i>	Wu <i>et al.</i> , 2002

Tabela 2 - Linhagens celulares utilizadas no presente estudo

Linhagens	Características relevantes	Referência
HEK 293	Células embrionárias de rim humano	Graham <i>et al.</i> , 1977
HEK 293/TLR5+	HEK 293 transfectada com TLR5 humano	Invivogen

3.4 Anticorpos e outros reagentes biológicos

Anticorpos anti-flagelina rFliCi foram produzidos no laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, inoculando camundongos com 5 µg de rFliCi + CFA. Esses anticorpos foram usados nos ensaios de imunodeteção por western blot, na diluição de 1:2.000. Anticorpos anti-IgG, anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongo conjugado à peroxidase foram adquiridos na Sigma e utilizados na diluição de 1:5.000 para IgG e IgG2a(c) e 1:10.000 para IgG1 nos ensaios de imunodeteção por ELISA. Estreptavidina conjugada com peroxidase foi adquirida na Sigma e usada nos ensaios de ELISPOT. O peptídeo sintético H-2K^b-restrito SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) foi adquirido da Peptide Specialty Laboratories (PSL GmbH), Heidelbergue, Alemanha, foram usadas nos estímulos dos ensaios celulares na concentração de 1 µg/mL.

3.5 Caracterização da expressão de flagelina Hag pela linhagem *B. subtilis* WB800

3.5.1 Preparação da flagelina purificada

A linhagem de *B. subtilis* WB800 utilizada para a extração do flagelo foi semeada em 500 mL de meio LB com 25 µg/mL de neomicina e incubada a 37 °C com agitação de 200 rpm durante 12 horas. As células foram coletadas por centrifugação a 6.000 rpm por 10 minutos e ressuspensas em 20 mL de PBS. A suspensão bacteriana foi agitada com homogeneizador industrial “blender” em 3 ciclos de 2 min, com intervalos de 2 min no gelo. Após a remoção das células, foi centrifugado a 10.000 rpm a 4 °C por 15 minutos para coletar o sobrenadante onde se encontra a proteína solúvel. A flagelina utilizada nos ensaios imunológicos foi submetida a aquecimento a 65 °C por 30 min, para promover a despolimerização do filamento flagelar extraído e, em seguida, submetida à remoção de LPS contaminantes com o detergente Triton X-114

3.5.2 Detecção e remoção de LPS

O nível de contaminação com endotoxina bacteriana foi determinado por meio do Kit Quantitative Chromogenic LAL (QCL-1000) da Cambrex, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Para descontaminação de soluções, foi adicionado o detergente não iônico triton X-114 para a concentração final de 1% (v/v). Essa solução foi mantida por 10 min no gelo para a dissociação da endotoxina da proteína e, posteriormente, mantida a 37 °C por mais 10 min para a formação dos micélios. Para separação das duas fases, o material foi centrifugado a 3.000 X g por 5 min e removeu-se a fase aquosa com a proteína Hag. O material foi lavado com 5 vezes o volume inicial, empregando-se filtros Amicon ultra (Millipore) com cut-off de 10 KDa, para a remoção do detergente residual.

3.5.3 Imunodetecção em filtro de nitrocelulose (Western blot).

A quantidade total de proteínas foi determinada usando-se o método BSA Pierce (BCATM Protein Assay Reagent A – Pierce) e a pureza determinada em gel de poliacrilamida (12,5 %) com coloração por Coomassie Blue R-250. Após a separação da proteína por eletroforese essa foi transferida para um filtro de nitrocelulose (Hybond-C Extra Amersham). Os sítios onde a proteína não ligou foram bloqueados por 2 h a 37 °C com uma solução de bloqueio (leite 5% em PBS-T) e, em seguida, a membrana foi tratada com anticorpo anti-FliC_i na diluição 1:2.000 por 2 h a 37 °C. Após quatro lavagens com PBS-T foi adicionado imunoglobulina de coelho conjugada à peroxidase reativa contra IgG de camundongo na diluição 1:5.000 e deixado por 2 h a 37 °C. Após novo ciclo de lavagens a membrana foi submetida à revelação por quimioluminiscência com o reagente de revelação (Kit ECL, Amersham), de acordo com especificações do fabricante. A revelação foi feita em câmara escura e o filme foi exposto durante 30 min e submetido à revelação com revelador fotográfico (GBX, Kodak).

3.6 Caracterização da atividade biológica da flagelina Hag

3.6.1 Produção *in vitro* de interleucina 8 (IL-8)

Células HEK 293 e HEK 293 transfectadas com plasmídeo contendo o gene que codifica para o receptor TLR5 (Invivogen, San Diego, USA) foram cultivadas por duas semanas em meio DMEM adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), na presença ou ausência de antibiótico blasticidina (1 µg/mL), respectivamente. Um dia antes do ensaio as células foram tratadas com tripsina (Cultilab), lavadas duas vezes com DMEM + 10% SFB, e ajustadas para aplicar 50.000 células viáveis por poço. As células foram incubadas por 12 h em estufa de CO₂, 37 °C, na presença ou ausência de blasticidina. No dia seguinte as células foram incubadas por cerca de 5 h com a flagelina Hag nas seguintes concentrações: 1 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,01 µg/mL; 0,001 µg/mL e 0,0001 µg/mL. Após esse período, o sobrenadante de cultura celular foi coletado e armazenado a -80 °C até o momento da quantificação de IL-8 por ELISA utilizando-se o kit BD OptEIA™ Mouse IL-8 ELISA set (BD Biosciences, San Diego, CA).

3.6.2 Produção *in vivo* de interleucina 6 (IL-6)

Camundongos Balb/C (5 animais por grupo) foram inoculados com uma dose de flagelina (FliCi ou Hag), via i.p., na concentração de 5 µg/100 µL por dose. Após 0,5 h; 2 h; 6h; e 12 h o soro dos animais foi coletado e armazenado a -80 °C para quantificação de IL-6 por ELISA utilizando-se o kit BD OptEIA™ Mouse IL-6 ELISA set (BD, Biosciences, San Diego, CA).

3.7 Estudos imunológicos

3.7.1 Animais.

As linhagens de camundongos isogênicos foram obtidas junto ao biotério de Isogênicos da Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP: BALB/c e C57BL/6. Os animais utilizados tinham entre 6 a 8 semanas de idade.

3.7.2 Protocolos de Imunização.

3.7.2.1 *Antígeno e adjuvantes utilizados nas imunizações.*

- Ovalbumina (OVA) (Sigma Chemical, St. Louis Louis, Mo, USA) foi administrada na dose de 12 µg/ animal, via subcutânea (s.c) ou intranasal (i.n.).
- Flagelina de *B. subtilis* (Hag) e flagelina recombinante de *S. Typhimurium* (FliCi), extraída e purificada no laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do Instituto de Ciências Biomédicas II da USP. Foram utilizadas nos protocolos de imunização das vias s.c. e i.n.

Os regimes vacinais adotados nas diferentes imunizações foram os seguintes:

- Via i.n.: 5 ou 10 µg da flagelina Hag ou 5 µg de FliCi purificada em coadministração ou não com OVA, administradas em volume máximo de 10 µl / narina. Com esquema de imunização de 3 doses, administradas nos dias 0, 21 e 28.
- Via s.c.: 5 ou 50 µg da flagelina Hag ou 5 µg de FliCi purificada em coadministração ou não com OVA, administradas em volume máximo de 100 µl. Com esquema de imunização de 3 doses, administradas nos dias 0, 21 e 28.

3.7.3 Detecção de anticorpos e ensaios celulares

3.7.3.1 ELISA

Os ensaios de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) foram realizados com 1 µg/poço da proteína OVA e 0,5 µg/poço da Hag dispostas em placas Maxisorp (Nunc). Após incubação de 12 h a 4 °C, as placas foram lavadas com PBS-T e bloqueadas com leite 5% em PBS-T. Em seguida, incubou-se as placas com soros provenientes dos animais imunizados em diferentes diluições, durante 1 h a 37 °C. Anticorpos anti-IgG, IgG1, IgG2a ou IgG2c de camundongos conjugado à peroxidase foram diluídos em PBS-T leite, nas concentrações descritas na seção 3.4 (anticorpos e outros reagentes biológicos), e incubadas nas placas previamente lavadas com PBS-T. A presença de anticorpos ligados aos antígenos foi visualizada com a solução de revelação por 15 min no escuro a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50 µl por poço de H₂SO₄ 9 N. As densidades óticas das reações foram determinadas a 492 nm em leitor de ELISA modelo MultiScan EX (Labsystems).

3.7.3.2 *Intracellular Cytokine Staining (ICS)*

Placas de fundo côncavo (Nunc) receberam 10⁶ células do baço por poço que foram incubadas por 72 h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ com as proteínas Hag ou OVA e 6 h antes de completar as 72 h foi adicionada a Brefeldin A (Golgiplug; Pharmingen). Como controle de estímulo, as células receberam o mesmo volume de meio DMEM sem proteína. Após esse período as células foram incubadas por 30 min a 4 °C com anticorpo anti-CD8 conjugado com PE-CY5 (BD PharMingen) ou anti-CD4 conjugado a FITC. Após a permeabilização com saponina por 20 min a 4 °C, as células foram tratadas com anticorpo anti-IFN-γ conjugado à ficoeritrina (PE) (BD PharMingen) por 30 min a 4 °C. As células foram ressuspensas em PBS e examinadas por citometria de fluxo utilizando o aparelho FACScalibur (BD Bioscience). Os dados foram analisados pelo programa FlowJo para a determinação das porcentagens de células IFN-γ+/CD4⁺ ou IFN-γ+/CD8⁺ sobre o total de células CD4⁺ ou CD8⁺ respectivamente.

3.7.3.3 ELISPOT (*Enzyme-linked immunosorbent spot*)

O ensaio de ELISPOT foi realizado para detectar células produtoras de IFN- γ específicas para as proteínas OVA e Hag e os peptídeos OVA específicos para células T CD4⁺ e T CD8⁺. Esse ensaio detecta citocinas liberadas em resposta a estímulos *in vitro* no nível de uma única célula e foi realizado segundo a metodologia descrita por Miyahira e colaboradores (1994). Após sete dias a última dose do esquema de imunização, os animais foram submetidos à eutanásia, seus baços retirados e as células utilizadas para o ensaio. Células (5×10^5) derivadas do baço de camundongos imunizados foram adicionadas em cada poço de uma placa de 96 poços (Millipore), previamente sensibilizada com anticorpo monoclonal de captura anti-IFN- γ de rato (BD, Pharmingen). O anticorpo de captura foi utilizado na concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$. As células foram incubadas por 24 h a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂ quando estimuladas ou não com o peptídeo (1 $\mu\text{g/mL}$ de peptídeo), ou incubadas por 72 h quando estimuladas ou não com as proteínas Hag ou OVA nas mesmas condições atmosféricas e de temperatura. No dia seguinte ou 72 h depois, as células foram desprezadas, a placa lavada três vezes com PBS e cinco vezes com PBS-T e incubada com anticorpo monoclonal anti-IFN- γ de camundongo biotinilado (BD, Pharmingen) na concentração final de 2 $\mu\text{g/mL}$. Após uma noite a 4 °C, a placa foi novamente lavada e adicionou-se estreptavidina peroxidase (Sigma). Após duas horas de incubação a temperatura ambiente, a placa foi lavada e submetida à revelação com uma solução contendo diaminobenzidina por 30 min. Os “spots” foram contados com auxílio do equipamento ImmunoSpot (Cellular Technology, Ltda.).

3.7.3.4 ELISA de citocinas

Para avaliação da produção de citocinas frente a um re-estímulo *in vitro*, os animais foram submetidos à eutanásia após 7 dias da última dose do regime vacinal e seus baços foram coletados para a obtenção dos esplenócitos. Os baços foram macerados em 5 mL de RPMI 1% e as células foram centrifugadas a 1.500 rpm e lavadas com RPMI 1%. Em seguida, as células foram tratadas com ACK (1 mL/baço) para a remoção das hemácias e novamente lavadas com RPMI 1%. As células foram contadas

em câmara de Newbauer e 10^7 células/mL foram incubadas em estufa de CO₂ a 37 °C com ou sem estímulo (OVA ou Hag) durante 72 h. Em seguida, as amostras foram coletadas e centrifugadas e os sobrenadantes coletados e estocados a -80 °C até serem usados para dosagem das citocinas por ELISA. O ensaio de ELISA foi realizado segundo protocolo descrito pelo fabricante (BD Biosciences).

3.8 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA) e a análise de variância (ANOVA) foi realizada seguida do pós teste de Turkey. O resultado foi considerado significativo quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

O trabalho se dividiu em duas etapas: a primeira foi baseada no desenvolvimento de diversos procedimentos voltados para purificação da flagelina Hag de *B. subtilis*. A segunda etapa consistiu na caracterização das propriedades imunogênicas e adjuvantes da proteína Hag em modelo murino.

4.1 Extração e purificação da flagelina Hag de *B. subtilis*

A purificação da flagelina Hag foi feita inicialmente com a escolha de uma linhagem de *B. subtilis* que expressasse boas quantidades da proteína. Analisamos a expressão de Hag em duas linhagens de laboratório: a linhagem 1012 e a linhagem WB800, caracterizada por não expressar proteases extracelulares (Ye *et al*, 1996). A Figura 1 apresenta os resultados relativos à expressão de Hag em extratos de proteínas extracelulares com as duas linhagens submetidas a condições de cultivo padrão (incubação a 37°C em meio LB com aeração até atingir a D.O._{600nm} de 1,5). Nas condições testadas, observamos que a expressão da Hag é semelhante nas duas linhagens analisadas. Além disto, observamos que a proteína Hag é a proteína extracelular majoritária representando pelo menos 80% das proteínas presentes nessa fração para as duas linhagens testadas. Portanto, definimos como linhagem padrão para o isolamento da flagelina a linhagem WB800 em função da não produção de proteases extracelulares, fato que poderia contaminar a preparação e reduzir o rendimento final da extração.

Figura 1 - Expressão de flagelina Hag em linhagens de *B. subtilis*. Os extratos com proteínas extracelulares foram analisados em SDS-PAGE e corados com Comassie blue. Amostras: 1) Extrato total de células de *B. subtilis* 1012, 2) Sobrenadante após homogeneização das células da linhagem 1012, 3) Marcador de massa molecular, 4) Extrato total de *B. subtilis* WB800 e 5) Sobrenadante após homogeneização das células da linhagem *B. subtilis* WB800.

Para padronizar a extração da flagelina foi necessário confirmar se os anticorpos policlonais anti-FliCi (flagelina recombinante de *S. Typhimurium*) disponíveis no laboratório, reconheceriam a flagelina Hag de *B. subtilis*. Conforme mostrado na figura 2 A e B por western blot, houve reconhecimento da proteína Hag pelos anticorpos anti-rFliCi.

Figura 2 - Extração e identificação da proteína Hag na linhagem WB800 de *B. subtilis*. (A) SDS-PAGE extrato total e fração de proteínas extracelulares. Amostras: 1) marcador de massa molecular, 2) Extrato total da linhagem *B. subtilis* WB800 e 3) Sobrenadante com proteínas extracelulares de *B. subtilis* WB800. (B) Imunodeteção para confirmação da identidade da proteína Hag de *B. subtilis* WB800. Amostras: 1) Extrato total da linhagem *B. subtilis* WB800, 2) Sobrenadante com proteínas extracelulares. A identidade da proteína foi confirmada após reação com anticorpos anti-flagelina gerados após imunização de camundongos com a flagelina FliCi de *S. Typhimurium*.

A figura 3 ilustra a cinética de crescimento da linhagem *B. subtilis* WB800 quando mantida a 37°C com agitação de 200 rpm durante 12 h. Como mostrado nesta figura, determinamos três densidades ópticas para avaliação da expressão da proteína Hag (0,5; 1,5 e 2,5).

Figura 3 - Curva de crescimento da linhagem *B. subtilis* WB800. A cultura foi mantida a 37 °C e agitação de 200 rotações por minuto. As setas indicam os pontos em que amostras foram recolhidas para extração da proteína Hag.

As três densidades ópticas trabalhadas correspondem ao início (D.O._{600nm} 0,5), meio (D.O._{600nm} 1,6) e fim (D.O._{600nm} 2,5), estando as duas primeiras amostras na fase de crescimento exponencial e a última na fase estacionária, de acordo com a curva de crescimento apresentada na figura 3. Amostras colhidas na densidade óptica de 2,5 mostraram-se mais adequadas para a extração da Hag, já que foi possível obter a proteína em maior concentração e com menos contaminantes quando comparada com as outras condições (Figura 4).

Figura 4 - Influência do estágio de crescimento sobre a extração da proteína Hag de *B. subtilis*. Amostras: 1) Marcador de massa molecular (MW); 2) Proteínas extracelulares obtidas de células recolhidas na D.O._{600nm} de 0,5; 3) Proteínas extracelulares obtidas de células recolhidas na D.O._{600nm} de 1,6; 4) Proteínas extracelulares obtidas de células recolhidas na com D.O._{600nm} de 2,5. Cada amostra contém uma quantidade total de proteínas equivalente a 5 µg.

Tendo determinado a melhor densidade óptica para a extração da flagelina, passamos a estudar a melhor condição para a remoção dos flagelos do corpo celular. Para isso determinamos o número de ciclos no homogeneizador (blender) necessário para a obtenção da maior quantidade da proteína e menor quantidade de contaminantes. Na figura 5 mostramos o efeito das condições de ruptura a que foram submetidos os cultivos de *B. subtilis* WB800 em 50 mL de meio Luria–Bertani (LB) até atingir a D.O._{600nm}

de 2,5, após aplicação de 1, 2, 3 e 4 ciclos de homogeneização. Para tanto, aplicamos no gel de SDS PAGE volumes iguais para cada condição. Definimos como condição ótima para extração da Hag três ciclos de homogeneização. Nessa condição, foi possível conseguir concentração semelhante da Hag quando comparada com o tratamento de quatro ciclos, com menor possibilidade de lise das células e consequente contaminação com proteínas não desejadas.

Figura 5 - Efeito da homogeneização sobre a extração da proteína Hag de *B. subtilis*.

Amostras: 1) Marcador de massa molecular, 2) Proteínas solúveis após um ciclo de homogeneização (rendimento final 0,123 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); 3) Dois ciclos de homogeneização (rendimento final 0,180 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 4) Três ciclos de homogeneização (rendimento final 0,240 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e 5) Quatro ciclos de homogeneização rendimento final (0,245 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Para confirmar se as condições anteriormente padronizadas se mantinham em volumes maiores, comparamos o processo realizado com diferentes volumes de cultivo: 50, 100, 250 e 500 mL. A extração a partir de 500 mL de cultura mostrou ser a condição mais apropriada, pois, além da proteína estar em maior concentração, observou-se menos contaminantes na preparação, conforme mostrado na figura 6. Na tabela 3 mostramos o rendimento nas diferentes condições testadas e confirmamos que o cultivo feito em 500 mL de cultura mostrou-se o mais adequado.

Figura 6 - Influência do volume de cultura sobre a pureza da proteína Hag extraída da linhagem WB800 de *B. subtilis*. Amostras: 1) Marcador de massa molecular; 2) Crescimento de *B. subtilis* WB800 em 50 mL; 3) Crescimento em 100 mL; 4) Crescimento em 250 mL; 5) Crescimento em 500 mL. Amostras com 5 µg de cada amostra. Crescimento em meio Luria-Bertani (LB) até D.O. (600nm) de 2,5.

Tabela 3 - Rendimento da proteína Hag após procedimento de extração com a linhagem WB800 de *B. subtilis*

Volume cultivo (mL)*	Rendimento (mg/L)**
50	239
100	241
250	240
500	245

*Volume de cultivo inicial antes do processo de extração;

** Rendimento em miligramas por Litro obtido em cada uma das diferentes condições testadas.

Uma vez estabelecido o protocolo de extração, a flagelina foi submetida a 65 °C por 30 min para dissociação dos monômeros do filamento flagelar e, posteriormente, determinação do grau de contaminação com LPS da solução proteica. Como demonstrado na tabela 2, a preparação apresentou níveis baixos de LPS, apesar de *B. subtilis* ser uma bactéria gram-positiva. A concentração inicial da proteína era de 4,72 mg e continha 44 unidades endotóxicas por miligrama. Um ciclo com triton X-114, como descrito em material e métodos, foi suficiente para remover os traços de endotoxina da preparação. Nessas condições, a perda da proteína foi de apenas 5,94 % da proteína inicial.

Tabela 4 - Quantificação do LPS contaminante em amostras de Hag submetidos ao tratamento com Triton X-114.

Triton (ciclos)	LPS* (EU/mg)	Concentração de Hag (mg)	Rendimento (%) ^A	Perda (%) ^B
0	44	4,72	100	0
1	< 0,1	4,44	94,06	5,94
2	< 0,1	4,14	87,71	12,29
3	< 0,1	3,56	75,42	24,58
4	< 0,1	3,25	68,85	31,15
5	< 0,1	3,10	65,68	34,32

* Presença do LPS medida em unidades endotóxicas por miligrama de proteína, < 0,1, refere-se a valores inferiores à sensibilidade (< 0,1 EU/mg) do ensaio.

^A Rendimento corresponde à porcentagem de proteína remanescente na fase aquosa coletada no final de cada ciclo de tratamento com Triton X-114.

^B Perda: refere-se à porcentagem de perda da proteína depois de cada ciclo com Triton X-114.

4.2 Avaliação da funcionalidade da proteína Hag de *B. subtilis*

A funcionalidade da proteína Hag obtida foi testada em ensaios *in vitro*, por meio da produção de Interleucina 8 (IL-8), e *in vivo*, por meio da medição de Interleucina 6 (IL-6) no soro de animais tratados parenteralmente com a preparação. A figura 7 ilustra a produção da citocina IL-8 de forma dose dependente mediada pela ligação da flagelina Hag ao receptor TLR5, sugerindo assim, que não houve alterações conformacionais que incapacitassem a proteína de ligar-se ao receptor.

Figura 7 - Atividade biológica da proteína Hag de *B. subtilis*. A produção de IL-8 foi medida em células HEK293 transfectadas com gene que codifica o receptor TLR5. Aliquotas com 5×10^4 células foram estimuladas por 5 horas com diferentes concentrações de Hag. Símbolos: (■) HEK293 TLR5⁺ estimuladas com Hag e (◆) HEK293 TLR5⁻ estimuladas com Hag.

A interleucina 6 (IL-6) é secretada em resposta a padrões moleculares associados a patógenos, dentre esses a flagelina. Sua ação pró-inflamatória se dá por meio do recrutamento e ativação de diferentes tipos celulares, o que em geral precede o aparecimento de muitas outras citocinas no sangue. Por isso, foi determinada a produção

de IL-6 no soro de camundongos BALB/c quando inoculados com uma única dose das flagelinas Hag e FliCd, em concentração de 5 µg/100µL, via intraperitoneal. Os resultados ilustrados na figura 8 demonstram que as flagelinas foram capazes de estimular a produção de IL-6 *in vivo*, alcançando o ponto máximo da produção duas horas depois de inoculadas as flagelinas, sugerindo que a proteína Hag se encontra em condições adequadas para ativação das diferentes células do sistema imune inato.

Figura 8 - Atividade biológica da flagelina Hag de *B. subtilis*. A produção de IL-6 foi medida em amostras de sangue de camundongos Balb/C após administração i.p. de 5 µg de flagelina Hag ou FliCd. Símbolos: (◆) Animais inoculados com Hag e (■) animais inoculados com FliCd.

4.3 Avaliação das propriedades imunológicas e adjuvantes da flagelina Hag de *B. subtilis*

Para caracterizar o efeito adjuvante da proteína Hag, animais foram imunizados pelas vias i.n. e s.c. em esquema vacinal de três doses utilizando como antígeno modelo a OVA (Figura 9). Grupos de 5 camundongos Balb/C foram imunizados pelas duas vias propostas e a partir dos soros coletados um dia antes de cada dose e no dia do sacrifício (19, 26 e 34), foram medidos os títulos de IgG, IgG1 e IgG2a séricos tanto para Hag como para OVA (figura 9).

Figura 9 - Regime vacinal e coleta de sangue nos animais imunizados.

As flagelinas são conhecidas por induzirem forte resposta de anticorpos anti-flagelina após administração por via parenteral. Na figura 10 A e B pode se observar que, para as duas vias testadas, os anticorpos séricos anti-Hag aumentaram gradativamente de acordo com o número de doses. Nota-se que, de acordo com o esperado, pela via s.c. os títulos de anticorpos foram maiores do que os encontrados após imunização pela via i.n.. Os maiores títulos alcançados foram observados em animais imunizados com 5 µg de Hag seja pela via s.c. como pela via i.n..

Figura 10 - Detecção de anticorpos IgG séricos específicos para Hag em animais imunizados por diferentes vias. Amostras séricas de animais Balb/C administrados por via s.c. (A) e i.n. (B) foram coletados para quantificação dos anticorpos IgG anti-Hag por ELISA. As formulações usadas para os diferentes grupos foram: tampão salina fosfato (PBS), flagelina purificada de *B. subtilis* (Hag 5 μ g), proteína OVA (12 μ g) em coadministração com 5 e 50 μ g de Hag pela via s.c. (Hag5, e Hag50) e OVA em coadministração com 5 e 10 μ g de Hag pela via i.n. (Hag5, e Hag10). Os dados mostrados representam a média dos resultados obtidos em dois experimentos independentes, com grupos compostos de 5 animais.

(A)

(B)

Para a análise das subclasses de IgG anti-Hag utilizamos o soro coletado uma semana após a última dose do esquema de imunização. Esses soros foram analisados para a presença de anticorpos IgG1 e IgG2a e expressos por meio da razão entre os títulos para as duas subclasses de IgG. Para a via s.c., observamos um padrão de resposta mista com leve tendência ao perfil Th2, especialmente nos animais vacinados com a coadministrada com menor quantidade de Hag. Para a via i.n. também foi obtida uma resposta mista e, de forma contrária ao observado em animais imunizados pela via de mucosa, observa-se que se manteve a resposta para um padrão Th2 nos animais imunizados com a maior quantidade de Hag (Figura 11 A e B).

Figura 11 - Subclasses de IgG1 e IgG2a dos anticorpos séricos anti-Hag nos diferentes grupos experimentais. A quantificação dos anticorpos IgG1 e IgG2a anti-Hag foi feita por ELISA a partir dos soros coletados dos camundongos Balb/C após cada dose administrada pelas vias s.c. (A) e i.n. (B). As formulações usadas foram: flagelina purificada de *B. subtilis* (Hag 5 µg), OVA (12 µg/dose) coadministrada com 5 e 50 µg de Hag (Hag 5 + OVA e Hag 50 + OVA) e OVA em coadministração com 5 e 10 µg de Hag pela via i.n. (Hag 5, e Hag 10). Os dados mostrados representam a média dos resultados obtidos em dois experimentos independentes, com grupos compostos de 5 animais.

(A)

(B)

A figura 12 ilustra o efeito adjuvante da proteína Hag para o antígeno modelo OVA. A resposta humoral dos animais Balb/C, haplotipo H-2d, contra a proteína OVA, administradas pelas duas vias, teve aumento gradual nos títulos anti-OVA após cada dose. Sendo para as duas vias, os títulos de anticorpos maiores obtidos com a formulação coadministrada com 5 µg de Hag. A administração das diferentes formulações pela via s.c. estimulou maior produção de anticorpos OVA específicos.

Figura 12 - Detecção de anticorpos IgG séricos específicos para OVA em animais imunizados por diferentes vias. Amostras séricas de animais Balb/C administrados por via s.c. (A) e i.n. (B) foram coletados para quantificação dos anticorpos IgG anti-OVA por ELISA. As formulações usadas para os diferentes grupos foram: tampão salina fosfato (PBS), proteína OVA (OVA), proteína OVA em coadministração com 5 e 50 µg de Hag pela via s.c. (Hag5, e Hag50) e OVA em coadministração com 5 e 10 µg de Hag pela via i.n. (Hag5, e Hag10). Os dados mostrados representam a média dos resultados obtidos de dois experimentos independentes, com grupos compostos de 3 animais, sem diferenças significativas de acordo com o pós teste de Turkey.

(A)

(B)

Nas diferentes formulações coadministradas com Hag como adjuvante tanto pela via s.c. como pela via i.n. em animais Balb/C, houve uma resposta balanceada das subclasses de IgG, Th1/Th2, para o antígeno OVA nos animais, como ilustrado na figura 13. Para os grupos controle OVA e a formulação coadministrada com 5 μ g de Hag da via s.c., que demonstrou maior produção de anticorpos OVA específicos, a resposta mostra

tendência para o tipo Th1. Enquanto a formulação com 50 µg de Hag da via s.c. e formulações da via i.n. demonstraram uma tendência para o tipo Th2.

Figura 13 - Subclasses de IgG1 e IgG2a dos anticorpos séricos anti-OVA nos diferentes grupos experimentais. A quantificação dos anticorpos IgG1 e IgG2a anti-OVA foi feita por ELISA a partir dos soros coletados dos camundongos após cada dose administrada pelas vias s.c. (A) e i.n. (B). As formulações usadas foram: proteína OVA (OVA) (12 µg/dose), OVA coadministrada com 5 e 50 µg de Hag (Hag 5 + OVA e Hag 50 +OVA) e OVA em coadministração com 5 e 10 µg de Hag pela via i.n. (Hag5, e Hag10). Os dados mostrados representam a média dos resultados obtidos em dois experimentos independentes, com grupos compostos de 5 animais.

(A)

(B)

Depois de completadas as três doses com as diferentes formulações vacinais os animais Balb/C foram sacrificados no dia 35 e os baços coletados para realização dos ensaios de ELISA de citocinas, ELISPOT e ICS. Para entender melhor o tipo de reações que estão sendo estimuladas entre as diversas células envolvidas na resposta imune adquirida e estabelecermos os perfis de ativação de linfócitos T CD4+ (Th1 ou Th2) para a resposta obtida e consideramos 3 citocinas para diferenciação dos perfis Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-12) e Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10). Das três citocinas propostas para caracterização do perfil de resposta celular do tipo Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-12), só conseguimos detectar a principal citocina ativadora de macrófagos, o IFN- γ . As outras citocinas não foram detectadas. As figuras 14 A e B ilustram os títulos de produção de IFN- γ das células de animais imunizados com as diferentes formulações tanto pela via s.c. quanto pela via i.n.. Os resultados sugerem que os animais que receberam as diferentes formulações vacinais foram capazes de responder diante a estimulação com a proteína OVA produzindo IFN- γ , mas, nota-se menor produção da citocina nas células dos animais imunizados com as formulações coadministradas quando comparadas com as dos grupos controles.

Figura 14 - Dosagem de IFN- γ produzido por células do baço dos camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais. Camundongos Balb/C foram previamente imunizados por via s.c. (A) ou i.n. (B) com três doses de tampão salina fosfato (PBS), flagelina purificada de *B. subtilis* (Hag), proteína OVA (OVA) (12 μ g/dose), proteína OVA em coadministração com 5 e 50 μ g de Hag pela via s.c. (A); e OVA coadministrada com 5 e 10 μ g de Hag (Hag 5 + OVA e Hag 10 + OVA, respectivamente). O padrão de expressão da citocina foi feita por Imunodeteção (ELISA), a partir dos sobrenadantes das culturas de células totais do baço dos animais previamente imunizados, depois de estimulados *in vitro* com a proteína OVA por três dias. Os dados correspondem a um experimento, realizado com grupos compostos de 3 animais.

(A)

(B)

Na dosagem das citocinas do tipo Th2 que medeiam a resposta imune adquirida contra a proteína OVA foi possível a detecção das citocinas IL-4 e IL-10, enquanto a IL-5 foi indetectável. Os resultados apresentados nas figuras 15 A e B sugerem que a produção de IL-4 foi expressivamente maior nos animais imunizados pela via s.c., sendo que o grupo controle Hag teve a menor produção desta citocina. Enquanto os grupos coadministrados tiveram maior produção quando comparada com o grupo Hag, mas, inferior à aferida para o grupo controle OVA. Na figura 15 B, referente aos animais imunizados pela via i.n. evidencia que para essa via não houve produção significativa de IL-4 e que apenas o grupo imunizado com Hag foi capaz de produzir IL-4 ainda que em baixa concentração (20 pg/mL) quando estimulado com OVA.

Figura 15 - Dosagem de IL-4 produzido por células do baço dos camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais. Camundongos Balb/C foram previamente imunizados por via s.c. (A) ou i.n. (B) com três doses de tampão salina fosfato (PBS), flagelina purificada de *B. subtilis* (Hag), proteína OVA (OVA), proteína OVA em coadministração com 5 e 50 µg de Hag pela via s.c. (A); e OVA coadministrada com 5 e 10 µg de Hag (Hag 5 +OVA e Hag 10 + OVA, respectivamente) pela via i.n. (B). O padrão de expressão da citocina foi feita por Imunodeteção (ELISA), a partir dos sobrenadantes das culturas de células totais do baço dos animais previamente imunizados, depois de estimulados *in vitro* com a proteína OVA por três dias. Os dados correspondem a um experimento, realizado com grupos compostos de 3 animais.

(A)

(B)

Para a IL-10, que inibe a produção de citocinas do tipo Th1, nos animais imunizados pela via s.c. o maior título encontrado quando estimulado com OVA, foi aquele imunizados apenas com OVA, enquanto que os outros apresentaram títulos semelhantes, mas inferiores a esse grupo controle. Na via i.n. a maior produção foi observada no grupo imunizado apenas com Hag, seguido pelos grupos experimentais, mas sem diferença significativa quando comparado com o grupo controle OVA (Figura 16 A e B).

Figura 16 - Dosagem de IL-10 produzido por células do baço dos camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais. Camundongos Balb/C foram previamente imunizados por via s.c. (A) ou i.n. (B) com três doses de tampão salina fosfato (PBS), flagelina purificada de *B. subtilis* (Hag), proteína OVA (OVA), proteína OVA em coadministração com 5 e 50 µg de Hag pela via s.c. (A); e OVA coadministrada com 5 e 10 µg de Hag (Hag 5 +OVA e Hag 10 + OVA, respectivamente) pela via i.n. (B). O padrão de expressão da citocina foi feita por Imunodeteção (ELISA), a partir dos sobrenadantes das culturas de células totais do baço dos animais previamente imunizados, depois de estimulados *in vitro* com a proteína OVA por três dias. Os dados correspondem a um experimento, realizado com grupos compostos de 3 animais.

(A)

(B)

Utilizamos dois outros ensaios para detecção das células responsáveis pela produção de IFN- γ a partir dos esplenócitos dos animais nos diferentes grupos de imunização. Os resultados mostrados na figura 17 A, B e C, correspondentes aos ensaios celulares realizados com células totais do baço de animais imunizados pela via s.c.. Nesse ensaio não se observou diferença significativa na ativação de células produtoras de IFN- γ entre os grupos após estimulação com OVA ou Hag. No ensaio de ICS, com marcação das células T CD4⁺ e T CD8⁺ produtoras de IFN- γ , se percebe uma diferença para o grupo coadministrado com 5 μ g de Hag quando estimulados com OVA, mas sem significância estatística. Para o ensaio de ELISPOT, igualmente não foi observada uma

ativação de resposta celular específica significativa contra a proteína OVA entre os grupos.

Figura 17 - Efeito adjuvante da Hag pela análise da ativação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ específicos para a OVA nos animais que foram imunizados pela via s.c. A resposta celular foi analisada por número de células totais do baço produtoras de IFN- γ por meio do (A) ELISPOT, (B) ICS para detecção do número de células TCD4⁺ e (C) ICS para detecção do número de células T CD8⁺. Camundongos Balb/C foram previamente imunizados com três doses: PBS (PBS); flagelina purificada de *B. subtilis* (Hag); proteína OVA (OVA), OVA coadministrada com 5 ou 50 μ g de Hag (Hag 5 + OVA e Hag 50 + OVA). A análise da produção de IFN- γ foi feita 35 dias após a imunização em células totais do baço, depois de estimuladas *in vitro* com OVA, Hag ou meio de cultura, conforme indicado na figura, por três dias. Os dados representam a média de dois experimentos com grupos de 3 animais. Os valores representam o percentual de células T CD4⁺ e T CD8⁺ Ova específicas produtoras de IFN- γ no total de linfócitos T (B e C).

(A)

(B)

(C)

Quando analisados os resultados de ativação de células produtoras de IFN- γ dos animais Balb/C imunizados pela via i.n., ilustrados na figura 18 A, B e C, pode se perceber que o único grupo que demonstrou uma pequena diferença no número de células T CD8⁺ ativadas tanto por OVA como por Hag, sem ser significativa, foi o da formulação coadministrada com 5 μ g de Hag quando comparada com o grupo controle OVA. Podemos também observar que o grupo controle Hag mostrou um expressivo aumento no número de células produtoras de IFN- γ quando estimuladas com Hag.

Figura 18 - Efeito adjuvante da Hag pela análise da ativação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ específicos para a OVA nos animais imunizados pela via i.n. A resposta celular foi analisada por número de células totais do baço produtoras de IFN- γ por meio do (A) ELISPOT, (B) ICS para detecção do número de células TCD4⁺ e (C) ICS para detecção do número de células T CD8⁺. Camundongos Balb/C foram previamente imunizados com três doses: PBS (PBS); flagelina purificada de *B. subtilis* (Hag); proteína OVA (OVA), OVA coadministrada com 5 e 10 μ g de Hag (Hag 5 + OVA e Hag 10 + OVA). A análise da produção de IFN- γ foi feita 35 dias após a imunização em células totais do baço, depois de estimuladas *in vitro* OVA, Hag ou meio de cultura, conforme indicado na figura, por três dias. Os dados representam a média de dois experimentos com grupos de 3 animais. Os valores representam o percentual de células T CD4⁺ e T CD8⁺ Ova específicas produtoras de IFN- γ no total de linfócitos T (B e C).

(A)

(B)

(C)

Em uma etapa final do trabalho foram usados animais do haplotipo H2b pertencentes à linhagem C57BL/6 com o objetivo de avaliar o efeito adjuvante da proteína Hag em outro perfil genético. Para os ensaios de imunogenicidade foi utilizada uma única concentração de flagelina Hag (5 μ g/dose) e empregamos o regime vacinal descrito

previamente (Figura 9). De forma semelhante, mantivemos apenas um ensaio para a avaliação das respostas celulares anti-OVA, a produção de IFN- γ por parte dos esplenocitos totais em ELISPOT quando estimulados com os peptídeos MHC I e II específicos da OVA. Nesses ensaios de imunização foi usada a flagelina de *S. typhimurium* (FliCi) para efeito comparativo das propriedades adjuvantes na mesma concentração empregada para Hag.

Na figura 19 avaliamos o efeito adjuvante da proteína Hag purificada em animais da linhagem C57BL/6. Os resultados obtidos indicam que nessa linhagem de camundongos os títulos de anticorpos anti-OVA medidos são inferiores àqueles observados com a linhagem Balb/C. No entanto, os resultados obtidos confirmam as propriedades adjuvantes de Hag após coadministração com a proteína OVA por via de mucosa ou parenteral. Um fato a destacar foi, ao contrário do observado com animais da linhagem Balb/C, a obtenção de títulos de anticorpos anti-OVA levemente superiores em animais imunizados pela via de mucosa em relação aos animais imunizados pela via parenteral. Além disto, nas condições experimentais empregadas, a flagelina FliCi de *S. Typhimurium* resultou na indução de títulos de anticorpos semelhantes aos observados em animais imunizados com a flagelina Hag de *B. subtilis*. Sendo os títulos de anticorpos anti-OVA obtidos com as formulações coadministradas, tanto com FliCi quanto com a Hag pelas vias s.c. e i.n., superiores aos encontrados com animais imunizados com OVA nas mesmas condições experimentais. Apesar das diferenças observadas nas duas linhagens de camundongos empregadas, os resultados demonstram que a flagelina Hag de *B. subtilis* apresenta efeitos adjuvantes significativos quando coadministrada com a proteína OVA em camundongos.

Figura 19 - Detecção de anticorpos IgG séricos específicos para OVA em animais imunizados por diferentes vias. Amostras séricas de camundongos haplotipo H-2b da linhagem C57BL/6, administrados por via s.c. (A) e i.n. (B) foram coletados para quantificação dos anticorpos IgG total anti-OVA por ELISA. As formulações usadas para os diferentes grupos foram: tampão salina fosfato (PBS), proteína OVA (12 μ g/dose) em coadministração com 5 μ g da proteína Hag ou rFliCi pelas vias s.c. e i.n. (Hag 5 μ g + OVA e rFliCi 5 μ g + OVA). Os dados mostrados representam os resultados obtidos de um experimento com grupos compostos de 4 animais.

(A)

(B)

Os dados obtidos na titulação de subclasses de IgG produzidos em animais C57BL/6 após a terceira dose são representados na figura 20. Diferente aos resultados obtidos com os animais Balb/C, pode se observar que em nenhum dos grupos das duas vias foram detectáveis os títulos de anticorpos IgG2c. Na via s.c., é observada maior produção de IgG1 no grupo que recebeu a formulação coadministrada com 5 μ g de Hag. Enquanto na via i.n., se percebem títulos semelhantes e superiores nas duas formulações

coadministradas com as flagelinas quando comparada com o grupo controle (OVA), mas sem diferenças estatisticamente significativas.

Figura 20 - Subclasses de IgG1 e IgG2c dos anticorpos séricos anti-OVA nos diferentes grupos experimentais. A quantificação dos anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2c anti-OVA foi feita por ELISA a partir dos soros coletados dos camundongos C57BL/6 após a última dose administrada pelas vias s.c. (A) e i.n. (B). As formulações usadas para os diferentes grupos foram: proteína OVA (OVA) (12 μ g/dose), proteína OVA em coadministração com 5 μ g da proteína Hag ou FliCi pelas vias s.c. e i.n. (Hag 5 μ g + OVA e FliCi 5 μ g + OVA). Os dados mostrados representam o resultado obtido de um experimento com grupos compostos de 4 animais. Ausência de barra representa valores não detectáveis dos anticorpos no grupo experimental.

(A)

(B)

Os resultados de ativação de células produtoras de IFN- γ dos animais C57BL/6 imunizados pelas vias s.c. e i.n., ilustrados na figura 21 A, B e C, demonstram que as formulações que usaram flagelinas como adjuvantes induziram um maior número de células T CD8⁺ específicas, ativadas pelo peptídeo OVA MHC I. Sendo que nos resultados obtidos com o grupo imunizado com Hag 5 μ g + OVA, pela via s.c., e no grupo imunizado com FliCi 5 μ g + OVA, pela via i.n., as diferenças na produção de IFN- γ mostraram-se significativas quando comparadas com os resultados obtidos com células dos mesmos grupos não estimulados com os peptídeos antígenos específicos e com células de animais imunizados apenas com OVA e estimulados com os peptídeos antígenos específicos.

Figura 21 - Efeito adjuvante de duas flagelinas pela análise da ativação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ específicos contra OVA nos animais imunizados pelas vias s.c. e i.n. A resposta celular foi analisada por número de células totais do baço produtoras de IFN- γ por meio do ELISPOT. Camundongos de haplotipo H-2b da linhagem C57BL/6 foram previamente imunizados com três doses: PBS (PBS); flagelina purificada de *B. subtilis* (Hag); flagelina purificada de *Salmonella typhimurium* (FliCi); proteína OVA (OVA) e OVA coadministrada com 5 μ g de Hag ou FliCi (Hag 5 μ g + OVA e FliCi 5 μ g + OVA). A análise da produção de IFN- γ foi feita 35 dias após a

imunização em células totais do baço, depois de estimuladas *in vitro* com o peptídeo OVA específico para células T CD4+, T CD8+ ou meio de cultura, conforme indicado na figura, por 24 horas. Os dados representam o resultado obtido de um experimento com grupos de 4 animais. * $P < 0.05$, diferença significativa em relação às células do mesmo grupo que receberam meio de cultura sem estímulo (Controle) ou OVA e reestimulação com os peptídeos antígenos específicos.

(A)

(B)

5 - Discussão

Nas últimas décadas foram descobertos inúmeros adjuvantes com propriedades moduladoras da resposta imune contra um antígeno modificando de diferentes formas o tipo de resposta induzida. Apesar disso, apenas cinco adjuvantes foram licenciados para o seu uso em formulações vacinais em humanos (O'Hagan *et al.*, 2009). Algumas das razões que dificultam a aprovação para uso em humanos de novos adjuvantes são: o baixo perfil de tolerabilidade, presença de reações locais significativas, e o alto custo. Sem dúvida, o principal problema é a segurança já que a ação de um adjuvante está correlacionada com sua toxicidade. O complexo desafio na descoberta de um novo adjuvante a ser aprovado é refletido no fato de que o adjuvante alum, descoberto a pouco mais de 90 anos, é ainda o adjuvante presente na maioria das formulações vacinais em uso (O'Hagan *et al.*, 2009; Mbow *et al.*, 2010 and Coffman *et al.*, 2010). Neste projeto, estudamos a possibilidade de se obter um novo adjuvante que consiga aliar as propriedades adjuvantes das flagelinas bacterianas às vantagens intrínsecas de segurança do *Bacillus subtilis*. Os resultados apresentados nesse trabalho refletem a complexidade da resposta imunológica gerada pelas flagelinas e o potencial papel adjuvante da Hag. Demonstramos que de acordo com a via de administração, i.n. ou s.c., igual formulação vacinal contendo em coadministração a flagelina Hag, pode promover diferentes perfis de resposta imunológica. A Hag demonstrou baixa imunogenicidade e baixa efetividade na indução de uma resposta imune celular, mas, em compensação, teve bom efeito adjuvante na indução de resposta de anticorpos antígeno específica, inclusive na via i.n.. Apesar da reduzida atividade em relação à ativação de respostas celulares em animais Balb/C, a flagelina Hag foi capaz de estimular significativamente a produção de IFN- γ por parte das células T CD8⁺ quando administrada em animais da linhagem C57BL/6, de forma semelhante ao obtido com a flagelin FliCi de *S. Typhimurium*. Dessa forma, esse trabalho mostra a viabilidade na obtenção de um adjuvante que além de consolidar os benefícios de um bom adjuvante, principalmente na estimulação da resposta humoral, e as propriedades inócuas da bactéria *B. subtilis*, é de fácil obtenção e altamente rentável para as pesquisas vacinais devido aos baixos custos e simples procedimentos requisitados para sua obtenção.

Sabendo que a análise comparativa sequencial é um método primário pelo qual podem ser identificados elementos funcionais, nota-se que as flagelinas Hag e FliCi possuem alta porcentagem de identidade nas regiões N- e C terminais o que poderia indicar uma conservação, pelo menos parcial, das propriedades imunomoduladoras dessas flagelinas uma vez que nesses domínios estão localizados os sítios de reconhecimento de receptores das células do sistema imunológico. Essas regiões por serem evolutivamente conservadas são alvo para o reconhecimento como padrões moleculares associados a patógenos por parte das células do sistema imunológico do hospedeiro (Gewirtz *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2001; Andersen-Nissen *et al.*, 2005; Honko *et al.*, 2005 and Lightfield *et al.*, 2008). Conforme pudemos observar, o alinhamento das regiões conservadas das flagelinas de *B. subtilis* e de *S. typhimurium* indicou valores de 46 e 53% de identidade nas regiões N- e C-terminal, respectivamente. Essas regiões envolvem 170 resíduos da região N- terminal e 100 resíduos na região C-terminal. Na região hipervariável praticamente nenhuma conservação foi observada entre as duas flagelinas, porém a flagelina Hag foi reconhecida pelos anticorpos anti-FliCi em ensaio de imunoblot sugerindo compartilhamento de epítomos nessa região ou a presença de epítomos para células B nas regiões conservadas. Essas informações nos levaram a avaliar diferenças nas propriedades inflamatórias e adjuvantes dessas flagelinas.

Em uma etapa inicial do trabalho foi preciso definir alguns parâmetros importantes para a extração e purificação da proteína flagelar de *B. subtilis* para posterior análise das características imunológicas. Comparamos a expressão da flagelina em duas linhagens de laboratório: a linhagem 1012 (Saito *et al.*, 1979) e a linhagem WB800 (Wu *et al.*, 2002) caracterizada por uma deleção genética que a faz deficiente na produção de sete proteases extracelulares e uma intracelular, mitigando assim, o problema da degradação de proteínas extracelulares pelas proteases secretadas. Os resultados obtidos demonstram que a linhagem WB800 apesar de ter sido manipulada geneticamente não apresentou alteração na produção de flagelina sendo semelhante à linhagem 1012 em relação a esse aspecto. Além disto, com o protocolo utilizado para extração da Hag foi também demonstrado ser possível obter a flagelina na forma solúvel e em grandes quantidades.

Observamos que a expressão da flagelina Hag varia durante o ciclo de crescimento do *B. subtilis*. De fato, nossas observações confirmaram resultados anteriores descritos por Bergara e colaboradores (2003) que demonstram a expressão variável do gene *hag* e um pico de expressão ao fim da fase exponencial do crescimento bacteriano. No ensaio da extração da flagelina em três fases do crescimento da cultura que correspondiam ao início, meio e fim do crescimento exponencial, observamos a maior expressão no ponto correspondente à fase estacionária, o que permitiu a obtenção da proteína em maior concentração e com menos contaminantes quando comparada com as outras condições. Determinada a melhor densidade óptica para a extração da flagelina, foi definida a melhor condição para a quebra e liberação dos flagelos em função do número de ciclos de agitação em homogeneizador tipo "blender". O uso de três ciclos de homogeneização resultou em bom rendimento da proteína no sobrenadante com um mínimo de lise celular, o que reduziu a presença de contaminantes na preparação final. O emprego da linhagem *B. subtilis* WB800 certamente contribui para reduzir o risco de perda da proteína. Por outro lado, a ausência de atividade proteásica indica que não ocorreu lise celular durante o procedimento de extração da flagelina, visto que essa linhagem produz algumas proteases intracelulares (Ye *et al.*, 1996 and Schallmey *et al.*, 2004).

Bactérias gram-positivas, em contraste com as bactérias gram-negativas, não possuem a membrana celular externa e, conseqüentemente, não produzem LPS, substância pirogênica que frequentemente contamina preparações proteicas derivadas de bioprocessos. Embora não produza LPS, detectamos a presença de endotoxina nas preparações de Hag, provavelmente decorrente de todas as condições laboratoriais empregadas durante o processo de extração e purificação. Essa constatação nos levou a realizar uma etapa de descontaminação com Triton X-114 que tem como princípio a formação de duas fases do sistema micelar aquoso graças à diferença entre os ambientes físico-químicos, possibilitando a retirada de LPS contaminante. De acordo com observações previamente publicadas (Aida *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1997 and Magalhães *et al.*, 2007), além dessas propriedades, o detergente dissocia a endotoxina da proteína, o que torna possível, sob condições apropriadas, a separação não só das moléculas de LPS livres senão também as moléculas associadas à proteína. Nesse procedimento de descontaminação de LPS foi possível reduzir a concentração de LPS (cerca de 40

unidades endotóxicas por miligrama) para níveis inferiores à sensibilidade do kit (0,1 EU/mg) com apenas um ciclo de tratamento com o detergente e uma perda de apenas 6% da proteína, valores semelhantes aos encontrados previamente por outros autores (Aida *et al.*, 1990)

Após definir o método de obtenção e purificação da proteína Hag, fomos analisar a funcionalidade da proteína pelas suas propriedades inflamatórias. Para tanto, determinamos a capacidade da preparação em induzir *in vitro* a produção de IL-8 utilizando culturas de células HEK-293 transfectadas com o gene que codifica o receptor TLR5. Os resultados demonstram claramente que a proteína Hag obtida mantém sua capacidade de interação com o receptor celular. De acordo com a literatura as propriedades biológicas das flagelinas estão associadas, pelo menos em parte, ao reconhecimento e ligação ao receptor TLR5, responsável por ativar uma cascata de sinalização via MyD88 resultando na ativação de NF- κ B e consequentemente na produção de mediadores inflamatórios, como TNF- α , IL-6 e IL-8 (Gewirtz *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2001; Honko *et al.*, 2004 and Mizel *et al.*, 2010). Desses mediadores inflamatórios, a IL-8, produzida por vários tipos de células incluindo monócitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais e epiteliais (Hoffmann *et al.*, 2002), é considerada de importância clínica. Isso se deve ao fato que, durante as primeiras fases da infecção, possui um papel fundamental no início e mediação da resposta imune inata pelo recrutamento de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos ao sítio da infecção (Huber *et al.*, 1991). Outro teste de funcionalidade para essa proteína foi realizado *in vivo* visando quantificar a produção de IL-6 em camundongos que receberam Hag por via intraperitoneal. Observamos um padrão de resposta esperado com aumento na produção de IL-6 nas primeiras horas após inoculação. A IL-6 é produzida por linfócitos T, fibroblastos e monócitos em resposta a padrões associados a patógenos e tem como base para a sua ação pro-inflamatória o recrutamento e ativação de diferentes tipos celulares, o que em geral precede o aparecimento de muitas outras citocinas no sangue (Eaves-Pyles *et al.*, 2001). Por tanto, os resultados obtidos mostraram que a proteína Hag manteve suas propriedades biológicas e capacidade inflamatória após o processo de extração e purificação.

Para a avaliação da capacidade adjuvante da Hag foi estabelecido um regime vacinal contemplando uma via de mucosa e uma via sistêmica. A escolha da via de inoculação tem um efeito significativo no tipo de resposta imune induzida em animais imunizados com flagelina como adjuvante (Adar *et al.*, 2009, Braga *et al.*, 2010 and Mizel *et al.*, 2010). Em geral, os estudos feitos com flagelinas empregam vias parenterais, em particular, a via s.c.. No entanto, as superfícies das mucosas constituem a principal entrada da maioria dos patógenos, e representam a primeira linha de defesa contra microrganismos patogênicos (Ramos *et al.*, 2004). Segundo vários autores, essa via além de induzir resposta imune local tem a capacidade de induzir efetivamente respostas sistêmicas resultando em proteção efetiva para o hospedeiro. De fato, o uso da via de mucosas no desenvolvimento de estratégias vacinais tem sido explorado com intuito de aproveitar as vantagens inerentes ao sistema imune de mucosas (Gewirtz *et al.*, 2001; Hawn *et al.*, 2003; Yuki *et al.*, 2003; Petrovsky *et al.*, 2004; Strindeli *et al.*, 2004 and Holmgren *et al.*, 2005). Desta forma, decidimos avaliar também o efeito adjuvante de Hag após co-administração com o antígeno pela via i.n.

O uso de flagelinas como adjuvantes vacinais é considerado contraditório devido à alta imunogenicidade (Parish, 1996; Sanders *et al.*, 2006 and Vijay-Kumar *et al.*, 2010). Nesse sentido, flagelinas de menor imunogenicidade seriam adjuvantes vacinais mais promissores. No presente trabalho, foram observados, tanto na via s.c. quanto na i.n., baixos títulos de anticorpos específicos anti-Hag que aumentaram gradativamente com o número de doses empregadas. Sendo esses títulos superiores para a via s.c. quando comparada com os da via i.n.. Tal fato se explica pelo controle do sistema imune de mucosa sobre a resposta desencadeada evitando que respostas exacerbadas ou potencialmente prejudiciais para o hospedeiro sejam induzidas. Essa característica é um dos pontos diferenciais entre o sistema imune de mucosa e o sistêmico, pois, esse último, normalmente funciona em meio estéril e a presença de qualquer antígeno externo faria com que a resposta desencadeada fosse maior (Holmgren *et al.*, 2005 and Lawson *et al.*, 2011). Trabalhos relatam que a deleção de resíduos da região hipervariável poderia reduzir a antigenicidade das flagelinas. Como publicado por Yoshioka e colaboradores (1995), a flagelina de *S. Typhimurium* (FliC_i $\Delta_{204-292}$) com deleção de 99 aminoácidos na região hipervariável foi pouco reconhecida pelos anticorpos dirigidos à flagelina intacta. Dessa forma, a proteína Hag representaria uma flagelina com mais baixa

imunogenicidade com conservação do seu potencial adjuvante e dirigindo a resposta desenvolvida pelo hospedeiro especificamente contra o antígeno.

O efeito adjuvante da proteína Hag na produção de anticorpos contra o antígeno-modelo OVA em animais Balb/C foi bem caracterizado para as duas vias. Em trabalho anterior, publicado por Huleatt e colaboradores (2007), a imunização de camundongos Balb/C por via parenteral com a flagelina FljB de *Salmonella* em co-administração com OVA não resultou em efeito adjuvante significativo para a resposta de anticorpos séricos OVA-específicos. Em nossos ensaios observamos ainda que a imunização pela via s.c. resultou em aumento em relação ao grupo que recebeu apenas OVA no regime de três doses. Esses resultados mostram-se semelhantes ao trabalho anterior em que animais Balb/C imunizados pela via i.n. com flagelina FljB de *S. Typhimurium* como adjuvante apresentaram aumento na resposta de anticorpos OVA-específicos (Pino et al., 2005). Em nossos ensaios adotamos a incorporação de 5 µg de Hag/dose como a concentração para caracterização das propriedades adjuvantes das flagelinas após administração pelas duas vias em função de trabalhos anteriores realizados com flagelinas de *Salmonella*. Os resultados obtidos com camundongos Balb/c e C57BL/6 em imunizações com a flagelinas Hag e FliCi como adjuvantes indicam que nas duas vias testadas as flagelinas de *B. subtilis* e *Salmonella* apresentam papel adjuvante semelhante frente às respostas de anticorpos anti-OVA, embora diferenças nos valores dos títulos de anticorpos tenham sido notadas entre as duas linhagens de animais, particularmente em relação às respostas sistêmicas induzidas nos animais C57BL/6. Nos animais Balb/C observamos uma melhor resposta na produção de anticorpos pela via s.c. quando coadministrada a formulação com Hag. Por outro lado, os animais C57BL/6 apresentaram pequena resposta específica a OVA. .

Em animais Balb/c imunizados com a flagelina Hag como adjuvante pelas vias s.c. e i.n. a tendência de modulação da resposta mediada por linfócitos auxiliares foi claramente mista, concordando com a tendência da resposta humoral relatada no trabalho de Lee e colaboradores (2006) quando imunizaram animais da linhagem Balb/C com a flagelina de *Vibrios vulnificus* pela via i.n.. Nos ensaios realizados para a determinação do padrão de resposta de anticorpos nos animais C57BL/6, houve detecção de altos títulos de anticorpos IgG1, mas não foi possível a detecção de IgG2c em nenhum dos grupos para as duas vias, em concordância com o trabalho de Cunningham e colaboradores

(2004) no qual demonstram que 14 dias após imunização, via intraperitoneal, em camundongos C57BL/6 com FliCi teve altos títulos de anticorpos IgG1, mas não IgG2c. Sugerindo assim, que as diferenças no background genético das duas linhagens de camundongos (Balb/C e C57BL/6) podem resultar em diferenças na ativação de linfócitos T CD4+ auxiliares, como sustentado por Sbrogio-Almeida e colaboradores (2004).

Avaliamos também a modulação do sistema imune dos animais imunizados com a flagelina Hag por meio da detecção de citocinas secretadas por células T a partir de baços de animais previamente imunizados e estimulados *in vitro* com o antígeno. Em semelhança a dados anteriormente publicados para flagelina de *Salmonella* (Dowling *et al.*, 2008), nossos resultados indicam que em camundongos Balb/C imunizados pela via s.c. não houve aumento na estimulação da produção de IL-10 nos animais imunizados com Hag em relação ao grupo controle sem adjuvante. Resultado semelhante foi obtido após medição da produção da IL-4, resultado que conflita com observações anteriores feitas por outro grupo após o uso de flagelinas de *Salmonella* (Didierlaurent *et al.*, 2004). Ao analisarmos o perfil das citocinas determinantes do padrão Th1 encontramos que a produção de IFN- γ foi estimulada pela flagelina Hag nos animais Balb/c. Esse dado reflete o resultado obtido no ELISPOT, no qual foram observadas as células produtoras de IFN- γ nos grupos co-administrados e no grupo controle imunizado apenas com OVA. Segundo Collins e colaboradores (1991), a redução das pontes dissulfeto é chave para o processamento das proteínas pelas células dendríticas e a OVA, utilizada como estímulo específico para os esplenócitos, contém uma ponte dissulfeto entre os resíduos 74 e 121 (Thompson *et al.*, 1978 and Stein *et al.*, 1991), o que poderia dificultar o correto processamento e apresentação dos epitopos alvo aos linfócitos específicos. Esse fato poderia explicar a dificuldade encontrada na medição de respostas celulares por meio de citometria e marcações intracelulares.

De acordo com o publicado por Nempont e colaboradores (2008), a detecção sistêmica da flagelina não envolve os mesmos determinantes moleculares que a detecção pela mucosa, o que explicaria diferenças nas propriedades adjuvantes de Hag quando administrada pelas diferentes vias, s.c. e i.n.. Os resultados obtidos dos experimentos realizados com animais Balb/C, previamente imunizados pela via i.n., sugere maior produção de IL-4 para o grupo controle Hag quando comparada com a produção detectada tanto nos grupos coadministrados como no grupo controle OVA. Para a

produção de IL-10 encontramos que Hag consegue estimular também a sua produção, mas, dessa vez, foi detectado produção da citocina nos grupos que receberam as formulações coadministradas, contrario ao sugerido para a IL-4. Ao analisarmos a produção de IFN- γ , pode-se observar que foi ligeiramente superior no grupo que recebeu apenas Hag quando comparados com os outros grupos, sugerindo que Hag por si só é capaz de estimular a produção de IFN- γ , como sugerido na literatura, porém, quando coadministrada com a OVA, os níveis detectados são semelhantes aos do grupo controle OVA.

A partir dos resultados obtidos do ELISPOT podemos observar que, nos animais Balb/C imunizados pela via i.n., houve um sutil incremento na produção de IFN- γ no grupo que recebeu 5 μ g de Hag em coadministração, enquanto os outros grupos mostraram produção semelhante aos não reestimulados. No entanto, a marcação intracelular (ICS) para detecção do IFN- γ produzido pelas células T CD8⁺ e CD4⁺, mostrou ligeira maior participação dos linfócitos T CD8⁺, em concordância aos trabalhos relatados por vários autores (Cuadros *et al.*, 2004, Braga *et al.*, 2010 and Ayres *et al.*, 2012) e o publicado pelo nosso grupo (Braga *et al.*, 2008), no qual é demonstrada a capacidade da flagelina (FliCd) em ativar células T CD8⁺. Entretanto, nós sugerimos que na produção do IFN- γ esteja envolvida a atuação de outros tipos de células além das células T CD8⁺, pois, como publicado por outros autores, o efeito adjuvante das flagelinas, graças à interação do receptor TLR5, pode ativar tanto células CD11c⁺ como macrófagos (Didierlaurent *et al.*, 2004; Bates *et al.*, 2009; Vijay-Kumar *et al.*, 2010 and Letran *et al.*, 2011). Nos ensaios de ELISPOT realizados com as células esplênicas de camundongos C57BL/6 imunizados pela via i.n. foram usados os peptídeos MHC I e II OVA restritos como reestímulo. Esses resultados demonstraram mais claramente o efeito adjuvante das flagelinas, Hag e FliCi, na ativação das células T, principalmente as células T CD8⁺, sendo evidenciado com diferença significativa, o papel adjuvante da Hag quando a via de imunização foi a s.c. e da FliCi quando a via de imunização foi a i.n..

Dessa forma, concluímos que a flagelina Hag de *B. subtilis* apresenta efeito modulador sobre o sistema imunológico de camundongos que resulta em ação adjuvante sobre a produção de anticorpos sistêmicos antígenos-específicos aliado a uma baixa imunogenicidade, refletida nos baixos níveis de anticorpos anti-Hag detectados nos

animais imunizados. Por outro lado, a facilidade na obtenção da proteína e a ausência de endotoxina reduzem de forma significativa o custo de produção da proteína. Tais características apontam para a viabilidade no uso da flagelina Hag como adjuvante em diferentes formulações vacinais.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nesse estudo representam uma contribuição importante sobre as propriedades imunomoduladoras da flagelina Hag de *B. subtilis* e fornecem evidências sobre a viabilidade na obtenção de compostos que além de possuir propriedades adjuvantes, não são tóxicos nem representam perigo no seu uso.

A flagelina Hag de *B. subtilis*, mostrou baixa imunogenicidade, porém, foi capaz de estimular o aumento na resposta imune humoral nos animais após a administração tanto pela via subcutânea como a intranasal, sendo a resposta contra o antígeno OVA mista com tendência para o perfil Th2 para os animais Balb/C e para os animais C57BL/6, totalmente Th2.

Foi demonstrada modulação da Hag na produção de IFN- γ por esplenócitos de camundongos Balb/C e C57BL/6.

A ativação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IFN- γ em animais Balb/C imunizados com OVA tanto pela via s.c. como pela via i.n. e sob o efeito adjuvante da Hag não foi demonstrado.

O efeito adjuvante na ativação das células T, principalmente as células T CD8⁺, da flagelina Hag foi evidenciado, com diferença significativa, em camundongos C57BL/6 quando a via de imunização foi a s.c. e usado o peptídeo MHC I OVA restrito como reestimulo.

Os resultados obtidos abrem perspectivas promissoras para o estudo do potencial da flagelina Hag de *B. subtilis* como adjuvante vacinal com outros modelos de imunização baseados em antígenos derivados de diferentes patógenos,

Referências*

Aderem A. Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000; 406: 782-7.

Adar Y. Singer Y. Levi R. Tzehoval E. Perk S. Banet-Noach C. Nagar S. Arnon R. Ben-Yedidia T. A universal epitope-based influenza vaccine and its efficacy against H5N1. *Vaccine*. 2009; 27: 2099–107.

Aida Y. Pabst MJ. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J Immunol Methods*. 1990; 132(2):191-5.

Akira S. Takeda K. Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate an acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001; 2: 675-80.

Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem*. 2003; 4: 499-511.

Andersen-Nissen E. Smith KL. Strobe SL. Barrett BT. Cookson SM. Aderem. Evasion of Toll-like receptor 5 by fl agellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102: 9247–52.

Andersen-Nissen E. Smith KL. Bonneau R. Strong R. Aderem A. A conserved surface on Toll-like receptor 5 recognizes bacterial flagellin. *J exp med*. 2007; 201 (2): 393-403.

Ayres JS. Vance RE. Cellular teamwork in antibacterial innate immunity. *Nat Immunol*. 2012; 13: 115-117.

Bargieri DY. Rosaa D. Braga C. Carvalho B. Costa F. Espíndola N. Vaze A. Soarese I. Ferreira LC. Rodrigues M. 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.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.lcmje.org> [2007 May 22].

Bargieri DY. Leite JA. Lopes SC. Sbrogio-Almeida ME. Braga CJ. Ferreira LC. Soares IS. Costa FT. Rodrigues MM. 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*. 2010; 28: 2818-26.

Barnes AG. Cerovic V. Hobson PS. Klavinskis LS. *Bacillus subtilis* spores: a novel micro particle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. *Eur J Immunol*. 2007; 37:1538–47.

Bates JT. Uematsu S. Akira S. Mizel SB. Direct stimulation of *tlr5*^{+/+} *CD11c*⁺ cells is necessary for the adjuvant activity of flagellin. *J. Immunol*. 2009;182:7539–47.

Bergara F. Ibarra C. Iwamasa J. Patarroyo JC. Aguilera R. Márquez-Magaña LM. CodY is a nutritional repressor of flagellar gene expression in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. 2003; 185 (10): 3118-26.

Bernstein DI. Smith VE. Sherwood JR. Schiff GM. Sander DS. DeFeudis D. Spriggs DR. Ward RL. Safety and immunogenicity of live, attenuated human rotavirus vaccine 89-12. *Vaccine*. 1998; 16 (4): 381-7.

Beutler B. Inferences. Questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*. 2004; 430 (6996):257–63.

Braga CJM. Massis LM. Alencar BCG. Rodrigues MM. Sbrogio-Almeida ME. Ferreira LCS. Cytotoxic T cell adjuvant effects of three *Salmonella enterica* flagellins. *Braz J Microbiol*. 2008; 39: 44–9.

Braga C. Rittner G. Muñoz J. Teixeira A. Massis L. Sbrogio-Almeida M. Taborda C. Travassos L. Ferreira LCS. *Paracoccidioides brasiliensis* Vaccine Formulations Based on the gp43-Derived P10 Sequence and the *Salmonella enterica* FliC Flagellin. *Infect immun*. 2009; 77 (4): 1700–7.

Braga C. Massis L. Sbrogio-Almeida ME. Alencar B. Bargieri D. Boscardin S. Rodrigues M. Ferreira LCS. CD8⁺ T cell adjuvant effects of *Salmonella* FliC α flagellin in live vaccine vectors or as purified protein. *Vaccine*. 2010; 28 (5): 1373-82.

Buzzo CL. Campopiano JC. Massis LM. Lage SL. Cassado AA. LemeSouza R. Cunha LD. Russo M. Zamboni DS. Amarante-Mendes GP. Bortoluci KR. A novel pathway for inducible nitricoxide synthase activation through inflammasomes. *J Biol Chem*. 2010; 285: 32087–95.

Cappola M. Gil Turnes C. Probiotics and immune response. *Ciência Rural*. 2004; 34 (4): 1297-303.

Coffman RL. Sher A. Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*. 2010; 33: 492-503.

Collins DS. Unanue ER. Harding CV. Reduction of disulfide bonds within lysosomes is a key step in antigen processing, *J Immunol*. 1991; 147: 4054-59.

Cookson BT. Bevan MJ. Identification of a natural T cell epitope presented by *Salmonella*-infected macrophages and recognized by T cells from orally immunised mice. *J Immunol*. 1997; 158: 4310-9.

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.

Cunningham AF. Ball J. Toellner KM. Serre K. Mohr E. *et al*. Responses to the soluble flagellar protein FliC are Th2, while those to FliC on *Salmonella* are Th1. *Eur J Immunol*. 2004; 34: 2986–95.

Detmer A. Glenting J. Live Bacterial Vaccines - a review and identification of potential hazard. *Microb Cell Fact*. 2006;5 (23): 1-12.

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.

Dowling D. Hamilton CM. O'Neill SM. A comparative analysis of cytokine responses, cell surface marker expression and MAPKs in DCs matured with LPS compared with a panel of TLR ligands. *Cytokine.* 2008; 41: 254-62.

Duc LH. Hong HA. Barbosa TM. Henriques AO. Cutting SM. Characterization of *Bacillus subtilis* probiotics available for human use. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70 (4): 2161-71.

Eaves-Pyles T. Murthy K. Liaudet L. *et al.* Flagellin, a novel mediator of Salmonella-induced epithelial activation and systemic inflammation: I κ B α degradation, induction of nitric oxide synthase, induction of proinflammatory mediators, and cardiovascular dysfunction. *J Immunol.* 2001; 166, 1248–60.

Flynn JL. Weiss WR. Norris KA. Seifert HS. Kumar S. So M. Generation of a cytotoxic T-lymphocyte response using a *Salmonella* antigen-delivery system. *Mol Microbiol.* 1990; 4: 2111-8.

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 β in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol.* 2006; 7: 576–82.

Franchi L. Eigenbrod T. Muñoz-Planillo R. Nuñez G. The Inflammasome: A Caspase-1 Activation Platform Regulating Immune Responses and Disease Pathogenesis. *Nat Immunol.* 2009; 10 (3): 241: 1-15.

Galli G. Borgogni E. Zedda L. Bardelli M. Malzone C. Nuti S. Tavarini S. Sammiceli C. Hilbert AK. *et al.* Adjuvanted H5N1 vaccine induces early CD4⁺ T cell response that predicts long-term persistence of protective antibody levels. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106: 3877-82.

Gavin AL. Hoebe K. Duong B. Ota T. Martin C. Beutler B. Nemazee D. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science*. 2006; 314: 1936–8.

Gewirtz AT. Simon PO. Smith CK. Taylor LJ. Hagedorn CH. O'Brien AD. Neish AS. Madara JL. *Salmonella typhimurium* translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. *J Clin Invest*. 2001;107: 99–109.

Gewirtz AT. Navas TA. Lyons S. Godowski PJ. Madara JL. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol*. 2001; 167 (4): 1882-5.

Graham FL. Smiley J. Russell WC. Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 1977; 36: 59–74.

Green DH. Wakeley PR. Page A. Barnes A. Baccigalupi L. Ricca E. Cutting SM. Characterization of two *Bacillus* probiotics. *Appl environ microbial*. 1999; 65 (9): 4288-91.

Hawn TR. Verbon A. Lettinga KD. Zhao LP. Li SS. Laws RJ. Skerrett SJ. Beutler B. Schroeder L. Nachman A. *et al*. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med*. 2003;198: 1563–72.

Hayashi F. Smith K. Ozinsky A. Hawn T. Yi E. Goodlett D. Eng J. Akira S. Underhill D. Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001; 410: 1099–103.

Hoffmann JA. Reichhart JM. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol*. 2002; 3: 121-6.

Holmgren J. Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. **Nat Med**. 2005; 11:S45–S53.

Honko AN. Mizel SB. Mucosal administration of flagellin induces innate immunity in the mouse lung. *Infect Immun*. 2004; 72: 6676 – 9.

Honko AN. Mizel SB. Effects of flagellin on innate and adaptive immunity. *Immunol Res*. 2005; 33 (1): 83-101.

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

Huber M. Cabib E. Miller LH. Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 2807-10.

Huleatt JW. Jacobs AR. Tang J. Desai P. Kopp EB. Huang Y. Song L. Nakaar V. Powell TJ. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine*. 2007; 25 (4): 763-75.

Im J. Jeon JH. Cho MK. Woo SS. Kang S-S. Yun C-H. Lee K. Chung DK. Han SH. Induction of IL-8 expression by bacterial flagellin is mediated through lipid raft formation and intracellular TLR5 activation in A549 cells. *Mol immunol*. 2009; 47: 614-22.

Inohara N. Ogura Y. Chen FF. Muto A. Nunez G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem*. 2001; 276: 2551-2554.

Janeway Jr CA. Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20: 197–216.

Janssens S. Beyaert R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16: 637-46.

Johnson PR. Feldman S. Thompson JM. Mahoney JD. Wright PF. Immunity to Influenza A Virus Infection in Young Children: A Comparison of Natural Infection, Live Cold-Adapted Vaccine, and Inactivated Vaccine. *J Infect Dis*. 1986; 154 (1): 121-7.

Kasturi SP. Skountzou I. Albrecht RA. Koutsouanos D. Hua T. Nakaya HI. Ravindran R. Stewart S. Alam M. Kwissa M. Villinger F. Murthy N. Steel J. Jacob J. Hogan RJ. García-Sastre A. Compans R. Pulendran B. Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature*. 2011; 470: 543-9.

Kuwajima G. Asaka J. Fujiwara T. Fujiwara T. Node K. Kondo E. Nucleotide sequence of the hag gene encoding flagellin of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1986;168: 1479-83.

La Vallie ER. Stahl ML. Cloning of the flagellin gene from *Bacillus subtilis* and complementation studies of an in vitro-derived deletion mutation. *J Bacteriol.* 1989;171 (6): 3085-3094.

Lawson LB. Norton EB. Clements JD. Defending the mucosa: adjuvant and carrier formulations for mucosal immunity. *Curr Opin Immunol.* 2011; 23: 1-7.

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

Letran SE. Lee S-J. Atif SM. Uematsu S. Akira S. McSorley SJ. TLR5 functions as an endocytic receptor to enhance flagellin-specific adaptive immunity. *Eur J Immunol.* 2011; 41: 29-38.

Lightfield KL. Persson J. Brubaker SW. Witte CE. von Moltke J. Dunipace EA. Henry T. Sun YH. Cado D. Dietrich WF. Monack DM. Tsolis RM. Vance RE. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin *Nat Immunol.* 2008; 9: 1171-8.

Liu S. Tobias R. McClure S. Styba G. Shi Q. Jackowski G. Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. *Clin Biochem.* 1997; 30 (6): 455-63.

López-Boado YS. Cobb LM. Deora R. *Bordetella bronchiseptica* flagellin is a proinflammatory determinant for airway epithelial cells. *Infect Immun*. 2005; 73 (11): 7525-34.

Luna MG. Martins M. Newton S. Costa S. Almeida D. Ferreira LC. Cloning and expression of colonization factor antigen I (CFA/I) epitopes of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in *Salmonella* flagellin. *Res Microbiol*. 1997;148: 217-28.

Luiz WB. Calvalcante RCM. Paccez JD. Souza RD. Sbrogio-Almeida ME. Ferreira RCC. Ferreira LCS. Boosting systemic and secreted antibody response in mice orally immunized with recombinant *Bacillus subtilis* strains following parenteral priming with a DNA vaccine encoding the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) CFA/I fimbriae B subunit. *Vaccine*. 2008; 26: 3998-4005.

Macnab RM. How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol*. 2003; 57: 77–100.

Magalhães PO. Lopes AM. Mazzola PG. Rangel-Yagui C. Penna TCV. Pessoa Jr A. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J Pharm Pharmaceut Sci*. 2007; 10 (3): 388-404.

Malherbe L. Mark L. Fazilleau N. McHeyzer-Williams LJ. McHeyzer-Williams MG. Vaccine adjuvants alter TCR-based selection threshold. *Immunity*. 2008; 28: 698-709.

Mazza P. The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism. *Boll Chim Farm*. 1994; 133 (1): 3-18.

Mbow ML. De Gregorio E. Valiante NM. Rappuoli R. New adjuvants for human vaccines. *Cur Opin Immunol*. 2010; 22: 411-6.

McBEAN AM. Thoms ML. Albrecht P. Cuthie JC. Bernier R. and the field staff and coordinating committee. Serologic response to oral polio vaccine and enhanced-potency inactivated polio vaccines. *Am J Epidemiol*. 1988; 128 (3): 615-28.

McDonald WF. Huleatt JW. Foellmer HG. Hewitt D. Tang J. Desai P. Price A. Jacobs A. Takahashi VN. Huang Y. *et al.* A West Nile virus recombinant protein vaccine that coactivates innate and adaptive immunity. *J Infect Dis.* 2007; 195: 1607–17.

McSorley SJ. Ehst BD. Yu Y. Gewirtz AT. Bacterial Flagellin Is an Effective Adjuvant for CD4+ T Cells In Vivo. *J Immunol.* 2002; 169: 3914-9.

Miao E. Alpuche-Aranda C. Dors M. Clark A. Bader MW. Miller S. Aderem A. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 β via Ipaf. *Nat Immunol.* 2006; 7: 569-75.

Mizel SB. West AP. Hantgan RR. Identification of a sequence in human Toll-like receptor 5 required for the binding of Gram-negative flagellin. *J Biol Chem.* 2003; 278: 23624-9.

Mizel SB. Bates JT. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potencial. *J Immunol.* 2010; 185: 5677-82.

Molofsky AB. Byrne BG. Whitfield NN. Madigan CA. Fuse ET. Tateda K. Swanson MS. Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts *Legionella pneumophila* infection. *J Exp Med.* 2006; 203 (4): 1093-104.

Moors MA. Li L. Mizel SB. Activation of interleukin-1 receptor-associated kinase by gram negative flagellin. *Infect Immunol.* 2001; 69: 4424-9.

Murthy KG. Deb A. Goonesekera S. Szabó C. Salzman AL. Identification of conserve 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.* 2004; 279: 5667-75.

Nempont C. Cayet D. Rumbo M. Bompard C. Villeret V. Sirard J-C. Dletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *J Immunol.* 2008; 181 (3): 2036-43.

Newton SMC. Jacob CO. Stocker BAD. Immune Response to Cholera Toxin Epitope Inserted in *Salmonella* Flagellin. Science. 1989; 244:70-2.

Newton SMC. Stocker BAD. Insertion of heterologous epitopes in *Salmonella* flagellin. Mem Inst Butantan. 1991; 53 (supl 1): 53-8.

O'Hagan DT. Valiante NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. Nat Rev Drug Discov. 2003; 2: 727-735.

O'Hagan DT. De gregori E. The path to a successful vaccine adjuvant – “The long and winding road”. Drug Discov Today. 2009; 14 (11/12): 541-51.

Paccez JD. Luiz WB. Sbrogio-Almeida ME. Ferreira RCC. Schuman W. Ferreira LCS. Stable episomal expression system under control of a stress inducible promoter enhances the immunogenicity of *Bacillus subtilis* as a vector for antigen delivery. Vaccine. 2005; 24: 2935-43.

Paccez JD. Nguyen HD. Luiz WB. Ferreira RCC. Sbrogio-Almeida ME. Schuman W. Ferreira LCS. Evaluation of different promoter sequences and antigen sorting signals on the immunogenicity of *Bacillus subtilis* vaccine vehicles. Vaccine. 2007; 25: 4671-80.

Parish CR. Immune deviation: a historical perspective. Immunol Cell Biol. 1996; 74 (5):449-56.

Pashine A. Valiante NM. Ulmer JB. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. Nat med. 2005; 11 (4): 563-8.

Peel M. Donachie W. Shaw A. Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied microscopy, SDS-PAGE and western blotting. J Gen Microbiol. 1988; 134: 2171-8.

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

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

Ramos HC. Rumbo M. Sirard JC. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol*. 2004; 12: 509-17.

Ren T. Zamboni DS. Roy CR. Dietrich WF. Vance RE. Flagellin-deficient *Legionella* mutants evade Caspase-1- and Naip-mediated macrophage immunity. *Plos Pathogens*. 2006; 2 (3):1-9.

SakamotoY-I. Sutherland KJ. Tamaoka J. Kobayashi T. Kudo T. Horikoshi K. Analysis of the flagellin (hag) gene of alkalophilic *Bacillus* sp. C-125. *J Gen Microbiol*. 1992;138: 2159-66.

Saito H. Shibata T. Ando T. Mapping of genes determining nonpermissiveness and host-specific restriction to bacteriophages in *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol Gen Genet*. 1979; 170: 117–122.

Salazar-Gonzalez RM. McSorley SJ. *Salmonella* flagellin, a microbial target of the innate and adaptive immune system. *Immunol Lett*. 2005; 101: 117–22.

Sanders CJ. Yu Y. Moore III DA. Williams IR. Gewirtz AT. Humoral immune response to flagellin T cells and activation of innate immunity. *J Immunol*. 2006; 177: 2810-8.

Sanders CJ. Franchi L. Yarovinsky F. Uematsu S. Akira S. Núñez G. Gewirtz AT. Induction of adaptive immunity by flagellin does not require robust activation of innate immunity. *Eur J Immunol*. 2009; 39 (2): 359-71.

Sbrogio-Almeida ME. Mosca T. Massis LM. Abrahamsohn IA. Ferreira LC. Host and bacterial factors affecting induction of immune responses to flagellin expressed by attenuated *Salmonella* vaccine strains. *Infect Immunol*. 2004; 72: 2546-55.

Schallmeyer M. Singh A. Ward OP. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. Can J Microbiol. 2004; 50 (1): 1-17.

Schijn VE. Induction and direction of immune responses by vaccine adjuvants. Crit Rev Immunol. 2001; 21:75-85.

Simon MI. Emerson SU. Shaper JH. Bernard PD. Glazer AN. Classification of *Bacillus subtilis* Flagellins. J Bacteriol. 1977; 130 (1): 200-4.

Smith KD. Andersen-Nissen E. Hayashi F. Strobe K. Bergman MA. Barret SLR. Cookson BT. Aderem A. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. Nat Immunol. 2003; 4: 1247-53.

Stein PE. Leslie AG. Finch JT. Carrell RW. Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 Å resolution. J Mol Biol. 1991; 221: 941-59.

Strindeli L. Filler M. Sjöholm I. Mucosal immunization with purified flagellin from *Salmonella* induces systemic and mucosal immune responses in C3H/HeJ mice. Vaccine. 2004; 22: 3797-808.

Thompson EO. Fisher WK. Amino acid sequences containing half-cystine residues in ovalbumin. Aus J Biol Sci. 1978; 31: 433-42.

Vance RE. Isberg RR. Portnoy DA. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. Cell Host Microbe. 2009; 6: 10-21.

Vijay-Kumar M. Carvalho FA. Aitken JD. Fikadara NH. Gewirtz AT. Tlr5 or NLRC4 is necessary and suficiente for promotion of humoral immunity by flagellin. Eur J Immunol. 2010; 40: 3528-34.

Wei LN. Joys TM. Covalent Structure of Three Phase-1 Flagellar Filament Proteins of *Salmonella*. *J Mol Biol*. 1985. 186: 791-803.

Weimer E. Lu H. Kock N. Wozniak D. Mizel S. A Fusion Protein Vaccine Containing OprF Epitope 8, OprI, and Type A and B Flagellins Promotes Enhanced Clearance of Non mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. 2009; 77: 2356-66.

Winstanley C. Morgan JA. The bacterial flagellin gene as a biomarker for detection, population genetics and epidemiological analysis. *Microbiology*. 1997; 143: 3071–84.

Westers L. Westers H. Quax W. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim Biophys Acta*. 2004. 16494: 299-310.

WU SC. Yeung JC. Duan Y. Ye R. Szarka SJ. Habibi HR. Wong SL. Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68: 3261–9.

Ye R. Yang LP. Wong S-L. Construction of protease-deficient *Bacillus subtilis* strains for expression studies: inactivation of seven extracellular proteases and the intracellular LonA protease. In: Hong SK. Lim WJ. (ed.), *Proceedings of the International Symposium on Recent Advances in Bioindustry*. Seoul, Korea: The Korean Society of Applied Microbiology, 1996; 160-9.

Yonekura K. Maki-Yonelura S. Namba K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature*. 2003; 424: 643-647.

Yoshioka K. Aizawa S. Yamaguchi S. Flagellar filament structure and cell motility of *Salmonella typhimurium* mutants lacking part of the outer domain of flagellin. *J Bacteriol*. 1995;170: 1090-3.

Yuki Y. Kiyono H. New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. *Rev Med Virol*. 2003. 13 (5): 293-310.

Zhang Z. Louboutin JP. Weiner DJ. Goldberg JB. Wilson JM. Human airway epithelial cells sense *Pseudomonas aeruginosa* infection via recognition of flagellin by toll-like receptor 5. *Infect Immun*. 2005; 73 (11): 7151-60.