KARINA SCARAMUZZI

INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DA SÍLICA MESOPOROSA NANOESTRUTURADA SBA-15 COMO ADJUVANTE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2013

KARINA SCARAMUZZI

INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DA SÍLICA MESOPOROSA NANOESTRUTURADA SBA-15 COMO ADJUVANTE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Augusto Sant´Anna

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Scaramuzzi, Karina.
Investigação dos mecanismos de ação da sílica mesoporosas nanoestruturada SBA-15 como adjuvante / Karina Scaramuzzi. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Augusto Sant´Anna.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Adjuvantes.

Versão do título para o inglês: Investigation of the adjuvant properties of the mesoporous nanostructured SBA-15 silica.

1. Partículas nanoestruturadas 2. Adjuvante 3. Células dendríticas 4. Linfócitos T 5. Anticorpos 6. Vacinas I. Sant´Anna, Prof. Dr. Osvaldo Augusto II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0169/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Karina Scaramuzzi.

Título da Tese: Investigação dos mecanismos de ação da sílica mesoporosas nanoestruturada SBA-15 como adjuvante.

Orientador(a): Prof. Dr. Osvaldo Augusto Sant´Anna.

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

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

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Aplicação de sílica nanoestruturada SBA-15 como adjuvante em imunizações pela via oral e seu papel na indução de memória imunológica" **protocolo nº 672/09**, sob a responsabilidade de Osvaldo Augusto Sant'Anna e Karina Scaramuzzi, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **10/11/2009.**

We certify that the research entitled "Applicability of the nanostructured SBA-15 silica as an adjuvant in oral immunizations and its role in the induction of immunological memory", protocol n° 672/09, under the responsibility of Osvaldo Augusto Sant'Anna and Karina Scaramuzzi, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 11/10/2009.

Vigência do Projeto: 12/2009 –03/2014	**N° de animais/espécie**
Laboratório de Imunoquímica	400 /camundongos – BALB/c e Swiss (Fêmeas)

São Paulo, 11 de novembro de 2009.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **151** nas fls. **78** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Osvaldo Augusto Sant'Anna, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Aplicação da sílica nanoestruturada SBA-15 como adjuvante em imunizações pela via oral e seu papel na indução de memória imunologica** do qual participou(aram) o(s) alunos **Karina Scaramuzzi,** 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 **17.11.09,** com validade de 3 anos.

São Paulo, 18 de novembro de 2009.

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

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

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

Of.CEUA.091 .12
WTL/mcgn

São Paulo, 05 de novembro de 2012.

REF.: Protocolo nº 151/09.

"Aplicação da sílica nanoestruturada SBA-15 como adjuvante em imunizações pela via oral e seu papel na indução de memória imunologica"

PrezadoProfessor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 17.11.2015.**

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

Cordialmente,

P/ Bunes

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

Ilmo.Sr.
Prof. Dr. Osvaldo Augusto Sant`Anna
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Home Office

No. PIL 60/13257

ANIMALS (SCIENTIFIC PROCEDURES) ACT 1986

PERSONAL LICENCE

to

carry out regulated procedures on living animals.

In pursuance of the powers vested in him by the above Act, the
Secretary of State hereby licenses

Ms K Scaramuzzi
I.I.I.I. - Sir Graeme Davies Building
University of Glasgow
120 University Place
Glasgow
G12 8TA

to apply the techniques specified in column a of paragraph 15 of the attached Schedule to the kinds of animals in column b of the same paragraph at the place or places specified in paragraph 14 of this Schedule, subject to the restrictions and provisions contained in the Act, and subject also to the limitations and conditions contained in this licence and to such other conditions as the Secretary of State may from time to time prescribe.

This licence shall be in force until revoked by the Secretary of State and shall be periodically reviewed by him.

Home Office
2 Marsham Street
London SW1P 4DF

For the Secretary
of State

2 December 2011

NB. This licence does not authorise the licensee to perform any of the procedures specified in it unless they are carried out in the course of a project for which there is a project licence in force under the Act.

SCOTTISH ACCREDITATION BOARD

This is to certify that

Karina Scaramuzzi

has been assessed as having satisfactorily completed accredited training for personnel working under the Animals (Scientific Procedures) Act 1986.

MODULES: One (non specific)***
Two & Three (small animals)***

TRAINING IN (list species): Rodents

TRAINING ORGANISED BY: ScotPiL Training Committee

CERTIFICATE NUMBER: SAB/SCT/W11/160 **DATE:** 26th October 2011

Course Organiser **For Scottish Accreditation Board**

Please note, this Certificate allows you to apply for a Licence, but it is not a licence to perform procedures under the Animals (Scientific Procedures) Act 1986

"Vivendo, se aprende; mas o que se aprende,
mais, é só a fazer outras maiores perguntas."

(João Guimarães Rosa)

Aos meus pais, avós, irmã e ao meu marido.

Eles me ensinaram a ter coragem.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e avós que sempre me transmitiram bondade e nunca me deixaram esquecer que devo pensar no bem do próximo, com honestidade e caridade. Por isso, estou aqui hoje e jamais abandonarei esses princípios.

A minha irmã, grande amiga e companheira de todas as horas.

Ao meu marido, por estar sempre ao meu lado, por entender minha paixão pela Ciência e por me segurar todas as vezes que ameacei cair. Minha gratidão e amor por você são eternos.

Ao meu querido amigo e orientador, pela confiança e por permitir que eu me tornasse uma doutora, desenvolvendo e colocando em prática minhas próprias ideias. Graças à sua generosidade, mais do que ter feito essa tese, tive a oportunidade de conhecer muitas pessoas, conviver com a diversidade e com as adversidades da vida. Cresci. Essa tese é uma parte ínfima de tudo que carrego comigo, de tudo que aprendi durante esse período. Obrigada por me ajudar a amadurecer.

A Dra. Denise Vilarinho Tambourgi, por ser uma referência de mulher que faz Ciência, para mim e para seus alunos. Obrigada por sempre me ajudar e permitir que meu trabalho fosse realizado nas melhores condições possíveis.

Ao Prof. Wilmar Dias da Silva, um amigo, que me mostrou que a generosidade ainda existe na nossa área. Obrigada por todas as dicas, conversas e pelas oportunidades de aprendizado. O senhor é um exemplo a ser seguido. Agradeço também a Halyka, pela amizade que rompeu as barreiras do laboratório e continua sólida até os dias de hoje.

A Dra. Ana Caetano de Faria e seus alunos, por me receberem tão bem na UFMG e pelo curto, mas proveitoso, convívio.

To Prof. Allan Mowat, for welcoming me so dearly at his lab. For always teaching me with a lot of patience, for the talks about results and Immunology and, most of all, for making me a better professional. Thank you! I will never forget your kindness!

To the Millings team (Simon, Stephanie, Pamela, Lotta and Vuk), I keep you all in my heart. Thanks for that wonderful year in rainy Glasgow! I really miss you guys!

A Aude Aumeunier, la meilleure des professeurs! Je souhaiterais te dire que j´ai presque tout appris avec toi. Merci de m´avoir accompagnée pendant cette année dans le froid de Glasgow et de m´avoir montré ce qu´est la science bien faite. Je n´oublierai jamais. Merci!

To the irish girl, Charlie Scott, that helped me so much and made my days a bit happier and warmer in Glasgow. Thanks for all the baking! You still owe me that brownie recipe! Miss you!

To the mexican boy, Alberto Blas, that was always a very good company and helped me to face the reality of being abroad, and alone, sharing with me his experience. I wish you all the best in the world! Gracias por todo!

To Calum Bain, the scottish guy who loves Australia, for always being so generous and patient with me in front of the LSR. I will always be grateful for everything!

To Tamsin, the english girl with the biggest latin-american heart. Thanks for the companionship and all the kindness!

To my landlords Nick, Joan and Helen for the friendship! Thanks for the warmest reception ever! I miss Cleveden Drive and hope to see you again someday.

Aos meus amigos queridos Tay Hwee Kee, Hatim Nada, Rodrigo Guabiraba e Anne-Gaelle Besnard pelos almoços descontraídos que me deixavam mais perto de casa. Acho que não conseguiria sem vocês! Thanks, grazie, obrigada, merci!

A querida Juliana Pavão Simões, encontramo-nos e não foi por acaso! Obrigada por absolutamente tudo!

Aos meus amigos, Elisabeth Freire, Taynara Leão Segurado e Rodrigo Palharini pelo suporte espiritual e amizade. Vocês acalmavam meu coração quando eu mais precisava!

A Lilian Manica, por dividir comigo as angústias e alegrias de estar na Escócia.

Aos os membros da minha banca de qualificação, Drs. Wilmar, Barbuto e Momtchilo pela rica conversa, pelas valiosas dicas e por me ajudarem a enxergar meus resultados com outros olhos. Muito obrigada!

Um agradecimento especial ao Dr. Momtchilo Russo, por me acolher no seu laboratório e pela oportunidade de expandir meu trabalho. Eliane Gomes, agradeço muito toda sua ajuda, e pela alegre recepção e carinho.

Para as Dras. Viviane Fongaro Botosso e Denise Cristina André, pesquisadoras da sessão de hepatite do Instituto Butantan, pelo companheirismo e colaboração essencial para o desenvolvimento dessa tese.

Para as Dras. Milene Tino de Franco e Aryene Trezena, pesquisadoras do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, pela amizade e parceria.

A Dra. Márcia Fantini, do Instituto de Física da USP, e seus alunos por compartilhar conhecimento e por todo auxilio na elaboração dos estudos contidos nessa tese.

Aos funcionários, pesquisadores e professores do Departamento de Imunologia, pelo auxílio, pelas conversas e pela amizade. Vocês são parte essencial da minha formação.

A Maria Eni Sacramento Santos pela imensa ajuda e amizade durante todos esses anos.

A Jotelma Ribeiro e Amanda Souza pelo agradável convívio e por todo auxílio prestado ao longo da minha formação.

Aos pesquisadores do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, Dra. Carla, Fábio, Dra. Fernanda, Jorge, e Dra. Rute pela amizade e pelos ensinamentos.

Aos pós-doutorandos do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, Dra. Danielle, Dra. Giselle e Dr. Aurélio, obrigada pela companhia!

As secretárias Elaine, Lia, Carolina e Denise, pela ajuda diária, pela amizade e pelo carinho de sempre. Vocês são fundamentais para o nosso laboratório, obrigada!

Aos colegas recém-chegados, Felipe França, Joel, Lígia, Vivian e Verônica. Muito sucesso para vocês!

Aos amigos do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, Angela, Daniela, Felipe, Mariana, Priscila e Rafaella, pelo apoio e torcida!

Aos amigos queridos Estevam, Luciana e Eliana, pelo aprendizado, desabafos, apoio e por essa amizade linda e eterna! Amo vocês!

As grandes amigas que conquistei no laboratório, Cinthya, Danielle, Elaine, Eliana, Gabriela, Isadora, Luciana e Marie!

Aos estudantes que já passaram pelo laboratório, Cássia, Mara, Priscila Lara, Thaís, Pedro e Daniel. A presença de vocês sempre foi muito agradável.

Aos funcionários do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, Alécio, Ana Cláudia, Ana Freire, Guilherme, Márcia, Maura, Ramos, Ricardo e Silvia, pela amizade, acima de tudo! Sem vocês, todos os trabalhos realizados nesse laboratório tornariam-se de difícil realização. Muito obrigada!

As amadas amigas do Instituto Butantan e do Departamento de Imunologia Lidiane Zito Grund, Mara Correa e Tatiane Gasparelo. Obrigada por todos esses anos de amizade verdadeira, de apoio e de torcida. Amigas pra vida toda!

Aos participantes da Comissão Julgadora desta defesa de tese de doutorado.

Aos funcionários da Biblioteca ICB-USP pela revisão textual.

A todos meus amigos e familiares, que sempre estiveram presentes, em todos os momentos. Vocês alegram minha vida!

"O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem."

(João Guimarães Rosa)

RESUMO

SCARAMUZZI, K. **Investigação dos mecanismos de ação da sílica mesoporosa nanoestruturada SBA-15 como adjuvante.** 2013. 161 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Sílicas mesoporosas, como a SBA-15, constituem-se de partículas de óxido de silício que, devido às suas propriedades físico-químicas apresentam potencial adjuvante. Para entender os mecanismos de ação da SBA-15, camundongos foram imunizados, pelas vias oral e/ou subcutânea (s.c.), com a proteína recombinante HBsAg ou ovalbumina (OVA) e apresentaram aumento significativo nos títulos de anticorpos específicos após imunização s.c. com ambos os antígenos em sílica; entretanto, somente a administração de HBsAg: SBA-15 induziu a produção de anticorpos pela via oral. O efeito da sílica na ativação de células dendríticas foi verificado após incubação com diferentes concentrações de SBA-15, indicando aumento na produção de IL-6, na proliferação e produção de IFN-γ por linfócitos T após a apresentação de OVA ou seus peptídeos. A resposta de linfócitos T *in vivo* mostrou aumento na resposta imune celular de animais que receberam a sílica, mas não indicou a indução da resposta de linfócitos T citotóxicos. Esses resultados confirmam o efeito adjuvante da SBA-15, principalmente para a resposta de anticorpos, e indicam que a sílica pode aumentar a disponibilidade dos antígenos às APC, potencializando a apresentação antigênica.

Palavras-chave: Partículas nanoestruturadas. Adjuvante. Células dendríticas. Linfócitos T. Anticorpos.

ABSTRACT

SCARAMUZZI, K. **Investigation of the** a**djuvant properties of the mesoporous nanostructurated SBA-15 silica.** 2013. 161 p. Ph. D. thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Amorphous silicon oxide particles named SBA-15 are promising adjuvant vectors due to its physicochemical properties and the aim of this study is to explore how they might act in promoting immune responses. Mice were orally and/or subcutaneously (s.c) immunised with the recombinant protein HBsAg or ovalbumin (OVA), showing a significant increase in the antibody titers after s.c. immunisation with both antigens in silica; however, only the administration of HBsAg: SBA-15 induced antibody production after oral immunisations. The activation of dendritic cell by silica was assessed by pulsing those cells with different concentrations of the particles, suggesting the interference of SBA-15 in the production of IL -6 and in T cell proliferation as well as IFN-γ production by T lymphocytes after presentation of this protein or its peptides *in vitro*. SBA-15 was able to enhance T cell responses *in vivo* but did not allow OVA to induce specific cytotoxic T lymphocyte activity. These preliminary data confirm that SBA-15 acts as an adjuvant for antibody responses and suggest that its effects may reflect enhanced availability of antigen, rather than direct effects on antigen presenting cells such as DC.

Keywords: Nanostructured particles. Adjuvant. Dendritic cells. T lymphocytes. Antibodies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Sílica mesoporosa nanoestruturada SBA-15.....35

Figura 2- Proteína recombinante do vírus HBV e a sílica mesoporosa nanoestruturada SBA-15 51

Figura 3- Esquema das imunizações com HBsAg 53

Figura 4- Produção de anticorpos anti-HBsAg em camundongos BALB/c imunizados pelas vias subcutânea ou oral (Esquema 1).....56

Figura 5- Produção de IgG1 e IgG2a anti-HBsAg em camundongos BALB/c imunizados pela via subcutânea, seguindo o esquema 1 de imunização 57

Figura 6- Produção de IgG1 e IgG2a anti-HBsAg em camundongos BALB/c imunizados pela via oral (Esquema 1).....58

Figura 7- Produção de IgA sérica e secretada (s-IgA) anti-HBsAg em camundongos BALB/c imunizados pela via oral (Esquema 1) 59

Figura 8- Produção de IgG, IgG1 e IgG2a anti-HBsAg em camundongos BALB/c imunizados pelas vias subcutânea ou oral (Esquema 2).....60

Figura 9- Esquema das imunizações com SBA-15 pela via subcutânea.....62

Figura 10- Títulos de IgG anti-OVA produzidos por camundongos C57BL/6 imunizados pela via subcutânea.....63

Figura 11- Esquema das imunizações com SBA-15 pela via oral 64

Figura 12- Níveis de IgG sérica anti-OVA produzidos por camundongos C57BL/6 imunizados pela via oral.....66

Figura 13- Porcentagem de encapsulação de ovalbumina a SBA-15 68

Figura 14- Encapsulação de citocinas a SBA-15 69

Figura 15- Recrutamento de células para o linfonodo drenante 24 e 72 horas após a administração subcutânea de SBA-15 71

Figura 16- Expressão das moléculas de MHCII, CD40, CD80 e CD86 em BMDC de camundongos C57BL/6 estimuladas por 6 horas com SBA-15 73

Figura 17- BMDC de camundongos C57BL/6 após tratamento com SBA-15 75

Figura 18- Viabilidade das BMDC de camundongos C57BL/6 em cultura com SBA-15 76

Figura 19- Efeito da sílica SBA-15 na fagocitose de ovalbumina marcada com fluoresceína (FITC) por BMDC, analisado por microscopia confocal 77

Figura 20- Efeito da sílica SBA-15 na fagocitose de ovalbumina marcada com fluoresceína (FITC) por BMDC, analisado por citometria de fluxo 78

Figura 21- Produção de IL-6 por BMDC estimuladas com diferentes concentrações de SBA-15 81

Figura 22- Efeito da SBA-15 na proliferação de linfócitos T *in vitro* 84

Figura 23- Efeito da SBA-15 na proliferação de linfócitos T $CD8^+$ *in vitro* 85

Figura 24- Produção de IFN-γ por linfócitos T $CD8^+$ em cocultura 86

Figura 25- Efeito da SBA-15 na proliferação de linfócitos T $CD4^+$ *in vitro* 87

Figura 26- Produção de IFN-γ por linfócitos T CD4$^+$ em cocultura 88

Figura 27- SBA-15 na apresentação antigênica a linfócitos T CD8$^+$ *in vivo*.....90

Figura 28- SBA-15 na proliferação de linfócitos T CD8$^+$ *in vivo*.....91

Figura 29- SBA-15 na apresentação antigênica a linfócitos T CD4$^+$ *in vivo*.....92

Figura 30- SBA-15 na proliferação de linfócitos T CD4$^+$ *in vivo*.....93

Figura 31- Efeito da SBA-15 na proliferação de linfócitos T citotóxicos *in vivo*.....95

LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARES

Figura suplementar 1- Gates utilizados para avaliar o recrutamento de células para o linfonodo drenante após inoculação subcutânea de SBA-15 106

Figura suplementar 2- Gates utilizados para avaliar a população de BMDC por citometria de fluxo 107

Figura suplementar 3- Gates utilizados para avaliar a população de células $CD4^+$ e $CD8^+$ produtoras de IFN-γ por citometria de fluxo 108

Figura suplementar 4- Gates utilizados para avaliar a proliferação de células $CD4^+$ e $CD8^+$ específicas para OVA por citometria de fluxo 109

Figura suplementar 5- *Dotplots*, histograma e gates utilizados para avaliar a marcação de células do baço de camundongos C57BL/6 com CFSE 110

Figura suplementar 6- Papel da SBA-15 na fagocitose da proteína OVA marcada com FITC 111

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Anticorpos monoclonais utilizados nos experimentos de citometria de fluxo..... 45

Quadro 2- Potencial de encapsulação da ovalbumina a sílica nanoestruturada SBA-15 67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 25
1.1 Vacinação e indução da resposta imune 25
1.1.1 Inflamação e imunidade inata.....25
1.1.2 Resposta imune humoral.....28
1.1.3 Resposta imune celular 30
1.2 Novas estratégias na imunização contra hepatite B.....31
1.3 Adjuvantes.....32
1.4 Sílicas mesoporosas nanoestruturadas altamente ordenadas 35
2 OBJETIVOS.....38
3 MATERIAIS E MÉTODOS 39
3.1 Animais 39
3.2 Sílicas mesoporosas altamente ordenadas.....39
3.3 Efeito adjuvante da SBA-15 em imunizações com HBsAg 40
3.4 Efeito adjuvante da SBA-15 em imunizações subcutâneas com ovalbumina 40
3.5 Efeito adjuvante da SBA-15 em imunizações pela via oral com ovalbumina 41
3.6 Coleta das fezes 41
3.7 Determinação dos títulos de anticorpos específicos produzidos em camundongos por ELISA.....42
3.8 Potencial de encapsulação da ovalbumina a SBA-15.....42
3.9 Avaliação da encapsulação de citocinas a SBA-15 43
3.10 Recrutamento de células do sistema imune para os linfonodos drenantes após administração subcutânea da sílica.....44
3.11 Citometria de fluxo.....44
3.12 Análise da produção de citocinas intracelulares 46
3.13 Avaliação *in vitro* do efeito da SBA-15 na ativação de células dendríticas diferenciadas da medula óssea de camundongos C57BL/6.....47
3.13.1 Obtenção e geração das DC 47
3.13.2 Ativação in vitro das BMDC pela SBA-15.....47

3.14 Ensaio de fagocitose com BMDC e OVA marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC).....48
3.15 SBA-15 na apresentação antigênica *in vitro*.....48
3.16 SBA-15 na apresentação antigênica *in vivo*.....49
3.17 SBA-15 na ativação de linfócitos CTL *in vivo*.....50
3.18 Análises estatísticas.....50
4 RESULTADOS.....51
4.1 Estudo do potencial adjuvante da sílica SBA-15 em imunizações com a vacina contra hepatite B.....51
4.1.1 Efeito da SBA-15 na produção de anticorpos séricos (IgA, IgG, IgG1 e IgG2a) e secretados (s-IgA) anti-HBsAg nas imunizações parenteral e oral.....54
4.2 Estudo do potencial adjuvante da sílica SBA-15 em imunizações parenteral e oral com ovalbumina.....61
4.2.1 Efeito da SBA-15 na produção de anticorpos séricos IgG anti-OVA em imunizações subcutâneas.....61
4.2.2 Efeito da SBA-15 na produção de anticorpos séricos IgG e IgA secretada anti-OVA em imunizações orais.....64
4.3 Análise do potencial de encapsulação de proteínas a sílica nanoestruturada SBA-15.....67
4.3.1 Encapsulação de ovalbumina.....67
4.3.2 Encapsulação de citocinas.....68
4.4 Recrutamento de células para o linfonodo drenante após a administração subcutânea de SBA-15.....70
4.5 Efeito da sílica SBA-15 na ativação de BMDC de camundongos C57BL/6.....72
4.5.1 Efeito da SBA-15 na expressão de MHCII e de moléculas coestimuladoras CD40, CD80 e CD86 nas BMDC.....72
4.5.2 Efeito da SBA-15 na produção de IL-6 por BMDC.....80
4.6 SBA-15 na apresentação antigênica *in vitro*.....82
4.7 SBA-15 na apresentação antigênica *in vivo*.....89
4.8 Ativação de linfócitos T citotóxicos pela SBA-15.....94
5 DISCUSSÃO.....97
6 CONCLUSÃO.....105

7 FIGURAS SUPLEMENTARES.....106
REFERÊNCIAS.....112
APÊNDICES 119
APÊNDICE A – Artigo: Relato de caso. Uma história contada no futuro: complexo imunogênico constituído por antígenos vacinais adsorvidos/encapsulados em sílica mesoporosas nanoestruturada.....121
APÊNDICE B – Artigo: Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15 133
APÊNDICE C – Artigo: Nanostructured SBA-15 silica as an adjuvant in immunizations with hepatites B vaccine 142
APÊNDICE D – Artigo: Generation of recombinant bacillus Calmette-Guérin and *Mycobacterium smegmatis* expressing BfpA and intimin as vaccine vectors against enteropathogenic *Escherichia coli*.....148
APÊNDICE E – Resumo: Hepatites B nanovaccine: The use of SBA-15 Silica as an Oral Adjuvant.....156
APÊNDICE F – Apresentação oral: SBA-15 nanostructured silica adjuvant enhances immune responsiveness and modulates sensibility to bacterial toxins.....158

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vacinação e indução da resposta imune

1.1.1 Inflamação e imunidade inata

A vacinação é o processo mais eficiente no controle de doenças infecciosas e grande é o interesse no desenvolvimento de vacinas eficazes, economicamente viáveis, que induzam boa resposta, garantindo memória imunológica duradoura e proteção contra infecções.

Após a vacinação, inicia-se o processo inflamatório, caracterizado pelo extravasamento de proteínas e migração de leucócitos do sangue para o tecido alvo; atua como elo entre a imunidade inata e adquirida frente aos danos teciduais e infecção, visando à eliminação dos patógenos e regeneração tecidual. Esses eventos iniciais da inflamação são protagonizados por mediadores como prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs), citocinas e quimiocinas, que regulam a permeabilidade vascular e o infiltrado leucocitário (ISOBE; KATO; ARITA, 2012; NATHAN, 2006; SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010).

Sinais moleculares diretos e indiretos (dano tecidual e/ou infecção) mantêm a resposta inflamatória pela ativação de células epiteliais, endoteliais e mastócitos, estimulando o influxo de polimorfonucleares (PMN) e monócitos para o foco inflamatório. Produtos bacterianos, células em necrose e citocinas ativam as células apresentadoras de antígenos (APC) e, consequentemente, aumentam a expressão de moléculas coestimuladoras e a produção de citocinas primordiais na ativação dos linfócitos T e desenvolvimento da imunidade adquirida. O término da inflamação é um processo ativo, controlado por mediadores endógenos que cessam a migração dos leucócitos para o foco inflamatório, alterando a vasodilatação e a permeabilidade vascular, eliminando células inflamatórias e debris de tecidos, restaurando a homeostasia no tecido inflamado (ISOBE; KATO; ARITA, 2012; NATHAN, 2006; SCHMIDT; NINO-CASTRO; SCHULTZE, 2012; SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010).

Em camundongos, como em humanos, existem duas subpopulações de monócitos fenotipica e funcionalmente distintas: a população de monócitos “inflamatórios” $GR1^{+}$, que expressa níveis elevados do receptor de quimiocina CCR2 e do ligante de CD62 (CD62L), e a população “residente” $GR1^{-}$, que apresenta alta

expressão de CX_3CR1, mas não expressa CCR2 e CD62L. Diferenças nas expressões dos receptores de quimiocinas e das moléculas de adesão influenciam diretamente o processo de migração dos monócitos para o foco inflamatório; acredita-se que, cada uma destas populações, utilize diferentes moléculas de adesão e receptores de quimiocinas nessa migração. A população $GR1^+$ migra do sangue para os tecidos através do ligante P-selectina glicoproteína 1 (PSGL1) e dos receptores CCR2 e CCR6 e são as células envolvidas nas atividades inflamatórias. Já monócitos $GR1^-$ dependem de CX_3CR1 e são os responsáveis pela cicatrização tecidual e angiogênese. Após a migração, os monócitos diferenciam-se em células dendríticas (DC) ou macrófagos, células fundamentais na apresentação antigênica e desenvolvimento da imunidade adquirida (SCHMIDT; NINO-CASTRO; SCHULTZE, 2012; SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010).

Componentes da imunidade humoral, produtos da cascata do sistema complemento, como C3b e C4b, e anticorpos IgG podem facilitar o processo da fagocitose através da opsonização do antígeno e da ligação com receptores CR1 e Fc. Ainda, macrófagos e DC utilizam receptores específicos, como os receptores de manose (CD206), capazes de reconhecer motivos conservados encontrados exclusivamente nos patógenos, discriminando agentes infecciosos de antígenos próprios. Todos esses receptores induzem o rearranjo do citoesqueleto de actina e, consequentemente, a internalização do antígeno. Entretanto, a ativação de cada tipo de receptor leva a diferentes mecanismos como alteração do citoesqueleto, maturação dos vacúolos e produção de citocinas (ADEREM; UNDERHILL, 1999; GAZI; MARTINEZ-POMARES, 2009).

O material fagocitado pelas APC é processado pela via endolítica, composta por endossomos e lisossomos. Além do meio ácido contido nesses compartimentos, enzimas hidrolíticas contribuem para a degradação desse material a pequenos peptídeos que serão reconhecidos por moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) classe II. Proteínas endógenas e antígenos intracelulares seguem a via citosólica. Depois do processamento, os peptídeos derivados de antígenos endógenos são transportados para o retículo endoplasmático e associam-se a moléculas de MHC classe I. Em alguns casos, pode ocorrer o que conhecemos como apresentação cruzada do antígeno. Nessa situação, antígenos extracelulares estimulam linfócitos $CD8^+$ via MHC I. Embora não se conheça completamente esse processo, acredita-se que o antígeno escape da

degradação no lisossomo e migre para o retículo endoplasmático, ligando-se ao MHC I (GAZI; MARTINEZ-POMARES, 2009).

Após a infecção, há um número extremamente reduzido de linfócitos T *naive* capazes de reconhecer os peptídeos derivados de determinado antígeno (aproximadamente 200 linfócitos T $CD4^+$ em camundongos). Por isso, os peptídeos devem ficar expostos por tempo suficiente na superfície das APC a fim de promover o encontro com linfócitos T *naive* específicos. As moléculas de MHC II, por exemplo, podem apresentar o mesmo antígeno por longos períodos de tempo, de dias a semanas, devido à alta afinidade entre peptídeos-moléculas MHC II (POS; SETHI; WUCHERPFENNIG, 2013).

Conclui-se, portanto, que uma das fases mais importantes para a ativação do sistema imune é a apresentação de antígenos processados e expressos por moléculas do MHC, auxiliada por moléculas coestimuladoras, para linfócitos T nos órgãos linfoides secundários. A expressão, na superfície celular das APC, do MHC-peptídeo, é acompanhada do aumento na expressão das moléculas coestimuladoras CD40, CD80, CD86 e da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, necessária para a diferenciação de linfócitos T *naive* em diferentes subpopulações de linfócitos T auxiliares (T_H) (SCHMIDT; NINO-CASTRO; SCHULTZE, 2012).

Nas DC, por exemplo, o primeiro sinal de ativação é a interação entre o complexo MHC-peptídeo e o receptor de células T (TCR), seguido da ligação das moléculas de adesão ICAM-1, presentes nas DC, com LFA-1 encontrada na superfície dos linfócitos T, fortalecendo o contato entre essas duas células. Estabelece-se, então, o segundo sinal de ativação: ligação entre as moléculas coestimuladoras das DC maduras, CD80 e CD86, com a molécula CD28 dos linfócitos T. Ainda, ocorrem interações entre as moléculas CD40 das DC com as CD40L dos linfócitos T, levando ao aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, TNF-α, IL-6 e IL-12 pelas DC (FRICK; GRUNEBACH; AUTENRIETH, 2010). Os altos níveis de IL-12, por exemplo, induzem a polarização para a resposta do tipo T_H1 e produção de IFN-γ, necessárias para o recrutamento de macrófagos e linfócitos T citotóxicos (CTL) (SCHMIDT; NINO-CASTRO; SCHULTZE, 2012).

1.1.2 Resposta imune humoral

A resposta humoral engloba diferentes mecanismos de defesa que, além da presença de anticorpos neutralizantes; englobam as atividades do sistema complemento, das moléculas de reconhecimento associadas a células (PRM), como a proteína C reativa, e dos anticorpos naturais, que visam o controle e a eliminação dos patógenos.

A cascata proteolítica do sistema complemento, composta por aproximadamente 35 proteínas solúveis ou ligadas às membranas celulares é constituinte central da imunidade inata. O sistema complemento atua através da proteólise e de mudanças conformacionais nas proteínas envolvidas na ativação das vias clássica, alternativa e das lectinas. Todas as vias convergem para as mesmas funções efetoras, como lise celular, aglutinação, opsonização e regulação da inflamação (BOTAZZI et al., 2010; DEGN; THIEL, 2013).

As PRM, que incluem, além da proteína C reativa, as colectinas, ficolinas e pentraxinas, localizam-se estrategicamente em diferentes compartimentos celulares como membrana plasmática, endossomos e citoplasma e se ligam a diversas espécies de bactérias e fungos. Em resposta a infecções e/ou danos teciduais, neutrófilos, macrófagos e DC produzem essas moléculas que, apesar da diversidade, conservam suas funções efetoras, atuando na ativação do sistema complemento, aglutinação, neutralização e opsonização. As PRM são conhecidas como ancestrais dos anticorpos (ante-anticorpos) (BOTAZZI et al., 2010).

Anticorpos naturais encontram-se em níveis relativamente baixos no soro, sem que haja prévia imunização do indivíduo. Um exemplo clássico são os anticorpos contra os grupos sanguíneos AB e H em humanos (SHILOVA et al., 2013). Esses anticorpos são produzidos especialmente por linfócitos B-1 $CD5^+$ de longa vida, que representam de 20-35% do total de linfócitos B. Linfócitos B-1 amadurecem antes dos B-2, durante a vida fetal e algumas semanas após o nascimento e persistem até a morte do indivíduo. Linfócitos B-1 respondem a imunização de forma restrita por não sofrerem hipermutação somática e maturação de afinidade, como ocorre em linfócitos B-2. O repertório e reatividade dos anticorpos naturais são conservados na espécie e entre as espécies. Os segmentos gênicos VJC das cadeias leves de imunoglobulinas (Ig) surgiram há

aproximadamente 430 milhões de anos e executam funções importantes como bloqueio e indução da fagocitose de patógenos (BOVIN, 2013).

A indução da resposta imune com produção de anticorpos específicos e neutralizantes sempre foi um dos principais objetivos das imunizações (BUONAGURO; TORNESELLO; BUONAGURO, 2011; SWANSON; PELANDA; TORRES, 2012). Linfócitos B, também APC e precursores de plasmócitos secretores de anticorpos, podem responder a antígenos, como polissacarídeos, independentemente de células T (TI), a partir da ligação direta às imunoglobulinas expressas na sua superfície, levando a uma rápida resposta de anticorpos; ou de modo dependente de linfócitos T_H (TD), através da interação CD40/CD40L e da influência de citocinas (PAPE et al., 2007; SWANSON; PELANDA; TORRES, 2012; VOS et al., 2000).

Linfócitos B *naive* migram para os linfonodos através das vênulas especializadas do endotélio alto (HEV) e permanecem nos folículos por aproximadamente 24 horas antes de retornarem à circulação pelo vaso linfático eferente. Após encontro com o antígeno, os que expressam moléculas de imunoglobulina (Ig) antígeno-específica aumentam a expressão do receptor de quimiocina CCR7 e migram para o limite entre o folículo e a área de linfócitos T, onde ocorre apresentação do antígeno via MHCII-peptídeo para linfócitos $T_{H.}$ Após ativação, os linfócitos B proliferam e sofrem mudança de isótipo de imunoglobulina, através do processo de recombinação gênica. A síntese e secreção de anticorpos em resposta a antígenos proteicos são estimuladas por sinais mediados pelo CD40 e influenciadas por citocinas como IL-2, IL-4 e IL-6. Alguns clones dessas células tornam-se plasmócitos, enquanto outros migram para os centros germinativos e sofrem hipermutação somática, gerando células de memória de alta afinidade e plasmócitos de vida longa (PAPE et al., 2007; SWANSON; PELANDA; TORRES, 2012).

Os níveis de anticorpos específicos produzidos durante a resposta humoral contra antígenos TD são detectáveis uma semana após a imunização; entretanto, anticorpos de alta afinidade são encontrados principalmente passadas 2 a 3 semanas. A resposta TD é caracterizada pela produção de isótipos de IgG, sendo que a prevalência de determinada subclasse depende do tipo de adjuvante administrado e/ou das citocinas produzidas após estímulo dos patógenos (SWANSON; PELANDA; TORRES, 2012).

1.1.3 Resposta imune celular

Inicialmente, as vacinações tinham como objetivo a produção de anticorpos protetores, sendo importante a indução da resposta de linfócitos B. A maioria das vacinas em uso como poliomielite, varíola e influenza, foram desenvolvidas sem estudo prévio sobre a resposta imune específica de linfócitos T. Vacinas compostas por antígenos TI, como polissacarídeos presentes nos pneumococos, são imunogênicas e oferecem proteção ao organismo; entretanto, questiona-se a geração de memória imunológica (DEFRANCE; TAILLARDET; GENESTIER, 2011). Estudos demonstraram ausência de anticorpos específicos circulantes após dose reforço com tais antígenos, não havendo indução de maturação de afinidade e sim a produção de anticorpos da classe IgM. Em contrapartida, polissacarídeos administrados com adjuvantes ou carreadores, levaram a uma resposta TD, com geração de memória imunológica (ROMEU et al., 2012). Acredita-se que linfócitos B-1b sejam fonte desses linfócitos de memória e dos plasmócitos específicos para a resposta contra polissacarídeos (DEFRANCE; TAILLARDET; GENESTIER, 2011). De qualquer forma, quando se analisa imunizações com antígenos proteicos, é consenso que a participação de linfócitos T_H é importante para a formação de linfócitos B de memória.

Através dos seus receptores (TCR), os linfócitos T reconhecem antígenos processados e ligados às moléculas codificadas pelos genes do MHC, expressas nas superfícies celulares. As moléculas MHC de classes I e II associadas a peptídeos antigênicos estimulam, através da interação com os co-receptores CD8 e CD4, linfócitos T citotóxicos (CTL) e T auxiliares (T_H), respectivamente. Após ativação, expansão clonal e diferenciação, essas células assumem funções efetoras diferenciadas que dependem dos estímulos recebidos e do microambiente em que se encontram (LEBIEN; TEDDER, 2008). CTL contribuem principalmente para a eliminação de patógenos intracelulares e células tumorais, enquanto T_H atuam na proliferação e diferenciação de linfócitos B e T, macrófagos e células dendríticas.

CTL participam ativamente da imunidade adquirida através da secreção de IFN-γ, TNF-α e IL-2 e da morte de células-alvo, mediada pelo receptor Fas e liberação de grânulos contendo perforina e granzimas. A exocitose dos grânulos é a via mais eficiente para eliminação de células tumorais ou infectadas por vírus. Esses

grânulos e suas proteínas citolíticas são gerados durante a maturação dos linfócitos T $CD8^+$ após a ligação MHCI-peptídeo (RUSSEL; LEY, 2002; SHEN et al., 2006).

Linfócitos T_H dividem-se em diferentes subpopulações. Células do tipo T_H1 participam nos processo de proteção contra patógenos intracelulares, reações de hipersensibilidade do tipo tardia e doenças autoimunes; produzem IL-2, IFN-γ, TNF-α e são responsáveis pela ativação de CTL, macrófagos, células *natural killer* (NK) e linfócitos B. Linfócitos T_H2 atuam em doenças alérgicas e na proteção contra patógenos extracelulares, exotoxinas bacterianas e helmintos, desenvolvendo uma resposta mediada por anticorpos e expressão de citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Linfócitos T_H3 são responsáveis pela secreção de TGF-β e regulação da resposta imune das mucosas. A subpopulação T_H17, que secreta a citocina pró-inflamatória IL-17, atua na proteção contra patógenos extracelulares e fungos, e em processos autoimunes. Os linfócitos T reguladores (T_{REG}) apresentam função supressora em doenças autoimunes, alergias, infecções e câncer (AFZALI et al., 2007; AKDIS; OZDEMIR; AKDIS, 2009; COFFMAN, 2006; FARIA; WEINER, 2005; HOGQUIST; MORAN, 2009; MATZINGER; KAMALA, 2011; OUKKA, 2008; ROMAGNANI, 2006).

1.2 Novas estratégias na imunização contra hepatite B

Apesar da disponibilidade de eficientes vacinas profiláticas contra hepatite B, as infecções pelo vírus da hepatite B humana (HBV) e suas doenças associadas permanecem como um grande problema de saúde pública. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) comprovaram que cerca de 2 bilhões de pessoas, em todo mundo, estão ou foram infectadas pelo HBV. Estima-se que ocorram 1 a 1,5 milhões de mortes por ano decorrentes dessa infecção, principalmente devido a doenças secundárias como cirrose e câncer hepático (BRUSS, 2007; MAKIDON et al., 2008; SCHMELTZER; SHERMAN, 2010; THOELEN; DE CLERQ; TORNIEPORTH, 2001; WEST; CALANDRA, 1996).

O HBV é um vírus de DNA envelopado que pertence à família *Hepadnaviridae*. O DNA circular dessa partícula infecciosa encontra-se envolvido por um envelope de bicamadas lipídicas em um nucleocapsídeo icosahedral. Dentro do envelope encontram-se as proteínas *large* (L), *medium* (M) e *small* (S). Além das partículas virais, as células infectadas pelo HBV produzem grandes quantidades de

partículas subvirais esféricas ou filamentosas de 22 nm de diâmetro (GERLICH et al., 2010; GLEBE, 2007).

A vacinação é a única estratégia eficiente para evitar a doença. As vacinas contra essa doença são produzidas com a tecnologia do DNA recombinante para expressar a proteína S do HBV (HBsAg) em leveduras. O Instituto Butantan iniciou a produção da vacina recombinante contra hepatite B em 1996. A vacina, Butang®, contém partículas purificadas da proteína S recombinante adsorvida em hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$). A Butang® tem a mesma eficácia e segurança que vacinas importadas que também utilizam técnicas de engenharia genética com leveduras *Hansenulla polymorpha* como vetores biológicos. O sistema utilizado pelo Instituto Butantan aumentou 10 vezes a expressão da proteína, além de diminuir significativamente os custos finais da produção da vacina (IOSHIMOTO et al., 1999).

Apesar de eficiente, o adjuvante da Butang®, $Al(OH)_3$, pode levar a efeitos adversos como exacerbada inflamação local, granuloma e até mesmo necrose tecidual. Ainda, direciona uma resposta do tipo T_H2 que é menos eficiente no combate a infecções virais (BREWER, 2006; COX; COULTER, 1997).

Há, portanto, o interesse crescente em investigar novas estratégias de imunização e, principalmente, de novos adjuvantes, que não interfiram na polarização da resposta imune e seja, ao mesmo tempo, seguro, economicamente viável, com estabilidade química e que modulem positivamente a resposta de indivíduos mal respondedores, como idosos e imunossuprimidos (BREWER, 2006; COX; COULTER, 1997).

1.3 Adjuvantes

Adjuvantes, do latim *adjuvare* (ajudar a), são compostos que potencializam a imunogenicidade de determinado antígeno, amplificando e/ou melhorando a duração da resposta imune específica. Atualmente, são fatores primordiais nas formulações vacinais, utilizados para potencializar a resposta contra peptídeos, proteínas recombinantes e vacinas de DNA (ALVING et al., 2012; BUONAGURO; TORNESELLO; BUONAGURO, 2011; EDELMAN; TACKET, 1990; LEROUX-ROELS, 2010). Uma das primeiras descrições de substâncias com potencial adjuvante ocorreu em 1916; Le Moignic e Pinoy imunizaram camundongos com uma emulsão de água, vaselina e *Salmonella typhimurium* inativada e verificaram o

aumento da resposta imune específica contra o microorganismo (JANSEN et al., 2005 *apud* PINOY; LE MOIGNIC, 1916). Entre os adjuvantes já descritos encontram-se as emulsões de água em óleo, surfactantes naturais e sintéticos, géis minerais e produtos bacterianos (BREWER, 2006). A utilização dos adjuvantes resulta na modulação da resposta imune adquirida, alterando os padrões de citocinas que a regulam, aumentando ou facilitando a apresentação de epítopos a células efetoras do sistema imunológico, influenciando a magnitude da resposta e a produção de isótipos de imunoglobulinas, além de preservar a integridade do imunógeno, prolongando o período de estímulo e o tempo de apresentação antigênica (ALVING et al., 2012; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; BUONAGURO; TORNESELLO; BUONAGURO, 2011; COX; COULTER, 1997; LEROUX-ROELS, 2010; SCHIJNS; DEGEN, 2007).

Entre os adjuvantes licenciados para uso em humanos, encontram-se os derivados de hidróxido e fosfato de alumínio que compõem quimicamente, há mais de 70 anos, a maioria das vacinas bacterianas e virais para as quais a proteção relaciona-se à geração de anticorpos neutralizantes (GLENNY, 1930). Apesar de amplamente utilizados, os mecanismos de ação desses adjuvantes ainda são alvo de estudos e não há consenso acerca de como os compostos de alumínio potencializam a resposta imune (KOOL et al., 2008; LAMBRECHT et al., 2009).

Desde a descoberta de que o Nlrp3 inflamassoma era ativado por partículas como cristais de urato monosódico, sílica e $Al(OH)_3$, acreditou-se ter desvendado o mecanismo de ação desse adjuvante (PELKA; LATZ, 2011). Kool et al. (2008) descreveu que sais de alumínio induziam morte celular e, subsequente liberação de ácido úrico e ativação indireta do Nlrp3. Após ativação, a proteína adaptadora ASC liga-se e ativa a procaspase-1. A caspase-1 ativa, catalisa a clivagem de moléculas da citocina pro-IL-1β, tornando-a ativa (MARTINON et al., 2006). A liberação de IL-1β por macrófagos e DC leva ao recrutamento de monócitos e DC e a ativação e migração dessas células para os linfonodos drenantes (KOOL et al., 2008).

Recentemente, Flach et al. (2011) mostrou que, ao contrário do que se acreditava, o hidróxido de alumínio não influencia na liberação lenta e controlada dos antígenos e que sua eficiência independe da ativação do inflamassoma, via Nlrp3, e da liberação de ácido úrico, pois não causa lesões teciduais ou morte celular; não há um receptor específico para o hidróxido de alumínio nas DC, e acredita-se que esse adjuvante interaja fortemente com os lipídeos presentes nas

membranas celulares, permitindo a fagocitose dos antígenos. O hidróxido de alumínio não é fagocitado pelas APC, assim o antígeno administrado não é apresentado como particulado e sim na forma solúvel, impossibilitando a apresentação cruzada a linfócitos T $CD8^+$ e a geração da resposta de CTL. Entretanto, esse adjuvante é um forte indutor da resposta humoral e direcionador para a resposta do tipo T_H2, com estímulo predominante à produção de IgG1, IgE e citocinas como IL-4 e IL-5 (BREWER, 2006; COX; COULTER, 1997; KOOL et al., 2008; PELKA; LATZ, 2011).

Ressalte-se que a polarização da resposta não é adequada para a proteção contra determinadas infecções e para vacinas em desenvolvimento contra AIDS, tuberculose e malária que, a princípio, requerem predominantemente resposta imune do tipo T_H1. Os Adjuvantes Incompleto (AIF) e Completo de Freund (CFA) são eficientes na geração de resposta do tipo T_H1, contudo, provocam forte reação inflamatória local, com formação de granuloma e necrose tecidual e não são licenciados para uso em humanos (BREWER, 2006; COX; COULTER, 1997; SEUBERT et al., 2011).

Outra emulsão de óleo em água, o MF59, é licenciado na Europa e utilizado nas vacinas contra gripe sazonal desde 1997. Como todos os adjuvantes, seus mecanismos de ação são pouco conhecidos. Estudos *in vitro* indicaram que, assim como $Al(OH)_3$, o MF59 não ativa DC mas induz a secreção de quimiocinas por granulócitos, macrófagos e monócitos, além de promover a diferenciação de monócitos em DC (SEUBERT et al., 2008). Análises do efeito adjuvante do MF59 *in vivo* indicaram o aumento da fagocitose por DC de camundongos e a regulação positiva de citocinas, quimiocinas e genes da resposta inata após injeção intramuscular. Observou-se o recrutamento de monócitos, granulócitos e DC (CALABRO et al., 2011; DUPUIS et al., 1998; MOSCA et al., 2008; SEUBERT et al., 2008; SEUBERT et al., 2011). Seubert et al. (2011) relatou que o efeito adjuvante do CFA e do MF59 independe da ativação do Nlrp3 e da caspase 1, mas depende da proteína adaptadora MyD88.

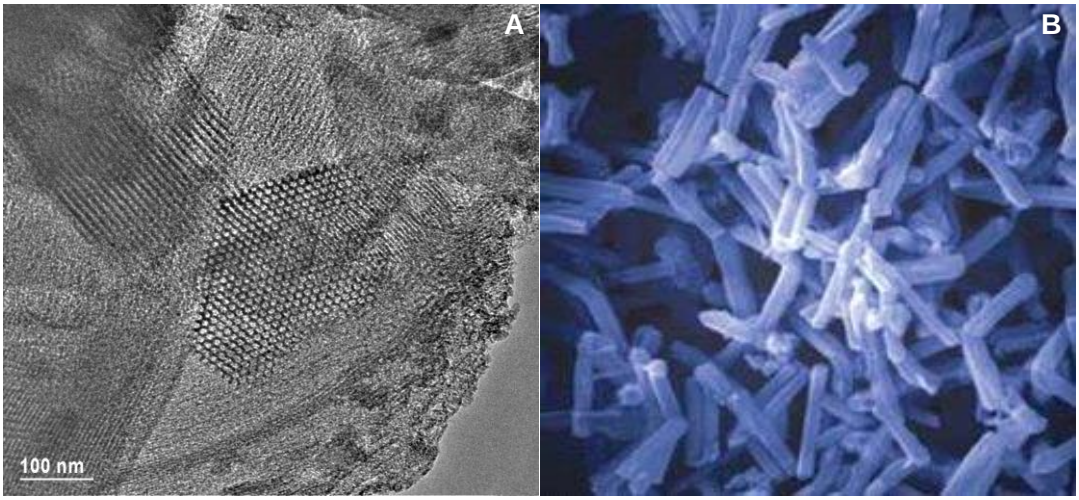
Assim, há interesse crescente de investigar estratégias de imunização e desenvolvimento de adjuvantes que não interfiram na polarização da resposta imunológica e sejam seguros, economicamente viáveis e possibilitem a melhoria da resposta em indivíduos constitutivamente maus respondedores.

1.4 Sílicas mesoporosas nanoestruturadas altamente ordenadas

As sílicas mesoporosas nanoestruturadas são partículas de óxido de silício (SiO_2) com estrutura altamente organizada que, devido às suas propriedades físico-químicas, apresentam potencial de aplicação em diferentes áreas, despertando grande interesse na comunidade científica. Esses materiais são capazes de interagir com átomos, íons e moléculas, não apenas em sua superfície, como também em seu interior (KRESGE et al., 1992; YANG; COOMBS; OZIN, 1997).

Descrita em 1998, a SBA-15 apresenta estrutura hexagonal com poros altamente ordenados e interligados (10 nm), paredes relativamente espessas e notável estabilidade térmica, hidrotérmica e mecânica **(Figura 1)** (MATOS et al., 2001; ZHAO et al., 1998). A SBA-15 é sintetizada em meio ácido, utilizando como agente direcionador de estrutura um copolímero tribloco, o poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) ($EO_{20}PO_{70}EO_{20}$), que pode auto agregar-se com espécies de silicatos formando a sílica mesoporosa (ZHAO et al., 1998).

Figura 1- Sílica mesoporosa nanoestruturada SBA-15.



(A) Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) da estrutura de poros arranjados hexagonalmente dentro dos tubos cilíndricos de comprimento ~ 2 µm. **(B)** Microscopia de escaneamento eletrônico (SEM) do interior de uma partícula mostrando a macro-porosidade e os tubos cilíndricos da sílica. Tamanho médio da partícula: 30 µm. Diâmetro dos poros: ~10 nm (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS e Poli-USP).

Apesar dos vários estudos voltados para a utilização de sílicas como veículo para diferentes substâncias, essas não haviam sido testadas quanto à capacidade de ativar eficientemente as APC, carrear e liberar imunógenos.

O primeiro estudo sobre a viabilidade de emprego desse material nanoestruturado como adjuvante da imunidade realizou-se no Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan. Camundongos isogênicos BALB/c, e geneticamente selecionados para a baixa produção de anticorpos (linhagem L_{III}) (SANT´ANNA et al., 1982), imunizados com Intimina 1β (proteína de *E. coli*), soro albumina bovina (BSA) ou veneno total da serpente *Micrurus ibiboboca*, encapsulados à SBA-15, apresentaram aumento significativo dos títulos de anticorpos específicos para a proteína e para o veneno da serpente, sendo a resposta secundária semelhante ou mais elevada comparativamente aos animais imunizados com esses imunógenos em AIF ou $Al(OH)_3$ (MERCURI et al., 2006).

Em 12 de setembro de 2005 foi depositada a Patente: *COMPLEXO IMUNOGÊNICO FORMADO POR ANTÍGENOS VACINAIS ENCAPSULADOS POR SÍLICA MESOPOROSA NANOESTRUTURADA,* em parceria com o Laboratório Cristália, que recebeu o número PI 0503817-0 e, em setembro de 2007, foi encaminhado seu depósito internacional. Atualmente, esse estudo está sob a proteção das patentes internacionais: **WO 07030901**, **IN 248654**, **ZA 2008/02277**, **KR 1089400** e **MX 297263**.

Em 2010, verificou-se que a sílica SBA-15 foi capaz de modular positivamente a resposta humoral de camundongos maus respondedores das linhagens geneticamente selecionadas L_{III} e L_{IVA}, os quais após imunizações com BSA pelas vias oral e intramuscular passaram a produzir títulos de IgG semelhantes aos das linhagens de animais bons respondedores (H_{III} e H_{IVA}); ainda, comprovou-se a não toxicidade da sílica para os animais imunizados e para macrófagos em cultura (CARVALHO et al., 2010). Em 2011, o efeito adjuvante da SBA-15 foi verificado em camundongos BALB/c imunizados pelas vias subcutânea e oral com a proteína recombinante HBsAg do vírus da hepatite B, principal componente da vacina Butang® produzida pelo Instituto Butantan, indicando o aumento nos títulos de anticorpos específicos após o uso dessa partícula nas formulações vacinais (SCARAMUZZI et al., 2011).

De maneira geral, as pesquisas sobre o efeito adjuvante da sílica nanoestruturada SBA-15, comprovaram o aumento nos títulos de anticorpos

específicos em imunizações contra antígenos de naturezas distintas, em diferentes espécies de animais, e por diferentes vias de administração. Sabe-se do seu efeito modulador na resposta humoral, do seu potencial de encapsular proteínas, e da sua não toxicidade para animais e macrófagos em cultura (CARVALHO et al., 2010; MERCURI et al., 2006; SCARAMUZZI et al., 2011). Entretanto, os efeitos da SBA-15 nas APC e sobre a resposta imune celular não haviam sido totalmente estudados. Certamente, desvendar esses mecanismos é de importância para a continuidade de nossos estudos e para a efetiva aplicação da sílica nanoestruturada.

2 OBJETIVOS

Esse projeto visa definir os mecanismos de ação da SBA-15 como adjuvante, através de análises *in vitro* e *in vivo* sobre o potencial de ativação do sistema imune, que incluem*:

- Comprovar o efeito adjuvante da sílica na resposta de anticorpos;
- Determinar o potencial de encapsulação de antígenos pelas partículas de sílica;
- Caracterizar o recrutamento de células do sistema imune para o linfonodo drenante após aplicação subcutânea da SBA-15, na ausência de antígenos;
- Avaliar o efeito da sílica na ativação de células dendríticas, através da expressão de MHC classe II, moléculas coestimuladoras e produção de IL-6;
- Estudar a fagocitose da SBA-15 pelas células do sistema imune inato, especialmente pelas DC;
- Determinar o papel da sílica na apresentação antigênica e na ativação de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ *in vitro* e *in vivo*;
- Estabelecer o efeito da SBA-15 na ativação de linfócitos T.

*Muitos dos resultados aqui apresentados referem-se aos experimentos realizados sob orientação do Prof. Dr. Allan Mowat da Universidade de Glasgow, no Glasgow Biomedical Research Centre, Division of Immunology, Infection and Inflammation, Reino Unido.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

O efeito adjuvante da sílica SBA-15 nas imunizações com HBsAg foi estudado em fêmeas isogênicas de BALB/c, entre 8 e 12 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan e mantidos no biotério do Laboratório de Imunoquímica deste mesmo Instituto.

Para os estudos dos mecanismos de ação da SBA-15 utilizou-se camundongos isogênicos C57BL/6 e transgênicos das linhagens OT-I (TCR específico para peptídeo $OVA_{257-264}$) e OT-II (TCR específico para peptídeo $OVA_{323-339}$), machos e fêmeas, entre 8 e 12 semanas de idade, criados e fornecidos pelo laboratório Harlan Olac (Bicester, UK) e mantidos sob condições controladas no biotério da Universidade de Glasgow.

Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelas Comissões de Ética em Experimentação Animal do Instituto Butantan (672/09), do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (151, fls. 78, livro 2) e da Universidade de Glasgow (60/13257).

3.2 Sílicas mesoporosas altamente ordenadas

A sílica mesoporosa SBA-15 foi fornecida pela Dra. Márcia C. A. Fantini do Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física da USP. As amostras de SBA-15 foram sintetizadas utilizando um copolímero tribloco, o poli-(óxido de etileno)-poli-(óxido de propileno)-poli-(óxido de etileno) (Pluronic P123, $EO_{20}PO_{70}EO_{20,}$ PM= 5800 - BASF Chemical Co., Mount Olive, NJ, EUA), o tetraetil-ortosilicato (TEOS) foi adquirido da Fluka/Sigma Chemical Co. (Milwaukee, WI, EUA). O ácido hidroclorídrico foi adquirido da Fisher Scientific Co. (Pittsburgh, PA, EUA). Todos os reagentes foram utilizados segundo protocolo de instrução. A caracterização da síntese e a adsorção das amostras foram seguidas conforme descrito por Matos et al. (2001).

3.3 Efeito adjuvante da SBA-15 em imunizações com HBsAg

O efeito adjuvante da SBA-15 nas imunizações contra hepatite B foi analisado em camundongos isogênicos BALB/c (n= 5 por grupo). Grupos de camundongos foram imunizados pela via subcutânea (s.c.) ou por gavagem com 0,5 µg de HBsAg: PBS ou 0,5 µg de HBsAg: 5 µg SBA-15, em volume final de 250 µL. As preparações foram deixadas a 4 °C por 24 horas antes das imunizações. Como controle, avaliou-se a presença de anticorpos específicos em animais não imunizados ou imunizados com 0,5 µg de HBsAg: 6,25 µg de $Al(OH)_3$, em volume final de 250 µL (s.c.).

No primeiro protocolo utilizado, **ESQUEMA 1**, passados 30 dias da primeira imunização s.c. ou v.o., todos os grupos receberam dose reforço pela via subcutânea com o antígeno em SBA-15 ou $Al(OH)_3$ para verificar se houve estímulo do sistema imunológico após imunização oral.

Em outro protocolo, **ESQUEMA 2**, foram administradas duas doses da HBsAg, tanto em SBA-15 quanto em $Al(OH)_3$, com intervalo de 30 dias entre as imunizações, pelas vias oral ou subcutânea para efeito comparativo das vias de administração.

Amostras individuais, sangria pelo plexo retro orbital e fezes, foram colhidas periodicamente para detecção de anticorpos específicos por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

3.4 Efeito adjuvante da SBA-15 em imunizações subcutâneas com ovalbumina

O efeito adjuvante da SBA-15 *in vivo* foi avaliado através da imunização de camundongos C57BL/6 (n= 4 por grupo) com 10 µg de OVA ou 10 µg de OVA: 250 µg SBA-15 no coxim plantar, via subcutânea, em volume final de 50 µL. Uma dose reforço foi administrada 30 dias após a primeira imunização. Após 10 dias das imunizações, os animais foram sangrados pela base da cauda para obtenção de soro. Os títulos de IgG sérica anti-OVA foram determinados pelo teste de ELISA e expressos pelas densidades óticas (D.O.) nas diferentes diluições dos soros.

3.5 Efeito adjuvante da SBA-15 em imunizações pela via oral com ovalbumina

Para a avaliação do efeito adjuvante da SBA-15 nas imunizações orais, camundongos C57BL/6 (n= 4 por grupo) foram imunizados por gavagem com 100 µg de OVA, 100 µg de OVA: 2500 µg SBA-15 e, como controle, receberam PBS, em volume final de 100 µL. O soro e extrato de fezes de animais imunizados com 10000 µg de OVA: 10 µg de toxina colérica (CT) foram utilizados como controle positivo do experimento. Três doses reforço foram administradas em intervalos de 30 dias entre elas. Os animais foram sangrados pela base da cauda e tiveram suas fezes coletadas para a dosagem de anticorpos específicos IgG sérica e IgA secretada, 7 dias após cada imunização. Os camundongos foram desafiados, 20 dias após a terceira dose, com 10 µg de OVA: 2000 µg hidróxido de alumínio administrados intraperitonealmente, em volume final de 100 µL. Sete dias após desafio, os animais foram sangrados para obtenção de soro e titulação de IgG sérica.

3.6 Coleta das fezes

Para a coleta das fezes, após as imunizações, os animais dos diferentes grupos experimentais foram colocados em gaiolas sem maravalha por 30 minutos. Os pellets fecais foram ressuspendidos em solução contendo inibidores de protease *Complete Mini* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EUA) 50 mM EDTA na proporção de um grama de fezes para 5 mL da solução, sendo novamente agitadas e centrifugadas a 14000 x g, 4 °C durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos, adicionando-se 10 µL de solução de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF - Boehringer Mannheim Co., Indianapolis, IN, EUA) 100 mM em etanol. Após nova centrifugação a 14000 x g, a 4 °C, 10 minutos, recuperou-se o sobrenadante em novos tubos contendo 10 µL de PMSF, 10 µL de NaN_3 1% e 50 µL de soro fetal bovino (SFB). As amostras foram estocadas a -20 °C para posterior análise de produção de anticorpos por ELISA.

3.7 Determinação dos títulos de anticorpos específicos produzidos em camundongos por ELISA

A produção de anticorpos específicos para os antígenos foi determinada pelo teste de ELISA. As dosagens foram realizadas em microplacas de 96 poços com propriedade de alta ligação Immunolon-4 (Corning, Amsterdam, Holanda) sensibilizadas com 100 μL por poço de solução de HBsAg 1,5 μg/mL ou 50 μL por poço de solução de OVA 10 μg/mL diluída em tampão Carbonato-Bicarbonato pH 9,6 (0,05 M Na_2CO_3 e 0,05 M $NaHCO_3$) por 16 horas a 4 ºC. Após este período inicial de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão PBS contendo Tween a 0,05% (PBS-T). Após as lavagens, as placas foram bloqueadas com 3% de soro albumina bovina (BSA) em PBS por 1 hora a 37 ºC. As amostras foram diluídas em série em PBS-3% BSA e incubadas durante 1 hora a 37 ºC. As placas foram lavadas e adicionados 50 μL por poço dos anticorpos anti-IgG (1: 200000), anti-IgG1 e anti-IgG2a (1: 1000) e anti-IgA (1:500) conjugados com biotina (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA). As amostras foram incubadas durante 1 hora a 37 ºC e, após novas lavagens, adicionou-se extravidina-peroxidase na diluição de 1:1000 em PBS-3% BSA, por 1 hora a 37 ºC. Seguiu-se lavagem 3 vezes em PBS-T e 100 μL do substrato TMB (KPL, Wembley, Middlesex, UK) foi adicionado; as placas foram mantidas no escuro até a reação ser revelada. A reação foi interrompida com 50 μL/poço de ácido cítrico 0,2 M. A leitura foi realizada a 450 nm utilizando o leitor de microplacas MRX II (Dynex, Worthing, West Sussex, UK).

Os títulos de anticorpos foram calculados como a maior diluição dos soros, cujas densidades óticas a 450 nm, foram 2 vezes superior àquelas determinadas para a reação com soros de animais não imunizados, diluídos na mesma proporção e expressos pelas densidades óticas (D.O.), títulos ou log_2 nas diferentes diluições dos soros.

3.8 Potencial de encapsulação da ovalbumina a SBA-15

O potencial de encapsulação da proteína ovalbumina (OVA) (Sigma-Aldrich Biotechnology Co., St. Louis, MO, EUA) a sílica SBA-15 foi determinado através de ensaios *in vitro* utilizando diferentes proporções (1: 1, 1: 2, 1: 5, 1: 10, 1: 25, 1: 30 e

1: 50) de OVA:SBA-15 (v/v) diluída em tampão fosfato (PBS) pH 7,4 (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), na concentração de 1000 µg/mL, em volume final de 1 mL. Após 24 horas de incubação, as proteínas não encapsuladas, foram recuperadas por centrifugação a 400 x g por 5 minutos. Determinou-se a concentração de OVA no sobrenadante utilizando o kit de dosagem de proteínas BCA (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, EUA) e a leitura realizada a 562 nm em espectrofotômetro. Como controle, soluções de OVA (1000 µg/mL) e SBA-15 (25000 µg/mL) em volume final de 1 mL de PBS foram analisadas. Os resultados foram expressos em concentração (µg/mL) e porcentagem de proteína livre no sobrenadante.

3.9 Avaliação da encapsulação de citocinas a SBA-15

A capacidade de encapsulação das citocinas IFN-γ e IL-6 pela sílica foi feita utilizando padrões de IFN-γ (100 ng/mL) e IL-6 (20 ng/mL) recombinantes (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) e diferentes quantidades de SBA-15 (10, 125, 500, 875 e 1250 µg/mL) (v/v), em volume final de 200 µL de PBS; a concentração de sílica utilizada nessas análises baseou-se nos ensaios realizados *in vitro*. Misturou-se 100 µL dos padrões de citocinas a 100 µL das diferentes concentrações de SBA-15 e, como controle, utilizou-se 100 µL dos padrões em 100 µL de PBS. Após 24 horas da adição das citocinas a SBA-15, as amostras foram centrifugadas (400 x g, 10 minutos), recuperando o sobrenadante e avaliando a quantidade de proteínas não encapsuladas por ELISA.

Microplacas de 96 poços com propriedade de alta ligação Immunolon-4 (Corning, Amsterdam, Holanda) foram sensibilizadas 50 µL por poço com os anticorpos de captura purificados anti-IFN-γ e anti-IL-6 (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) diluídos 1:500 em tampão Carbonato-Bicarbonato pH 9,6 (0,05 M Na_2CO_3 e 0,05 M $NaHCO_3$) por 16 horas a 4 ºC. Após incubação, as placas foram lavadas três vezes com tampão PBS contendo Tween a 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com 3% de BSA em PBS por 1 hora a 37 ºC. Após lavagens, as amostras foram distribuídas em triplicatas e sem diluição nas placas, em volume final de 50 µL por poço, e incubadas por 1 hora a 37 ºC. Os padrões de citocinas recombinantes IFN-γ (100 ng/mL) e IL-6 (20 ng/mL), utilizados para obtenção das curvas-padrão, foram adicionados em duplicata às placas e diluídos em série em PBS-3% BSA. Após

incubação de 1 hora a 37 ºC, as placas foram lavadas e adicionados 50 μL por poço dos anticorpos de detecção biotinilados, anti-IFN-γ (1: 500) e anti-IL-6 (1: 500) (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA). Após nova incubação e lavagens, adicionou-se extravidina-peroxidase (Sigma-Aldrich Biotechnology Co., St. Louis, MO, EUA) na diluição de 1:1000 em PBS-3% BSA, por 1 hora a 37 ºC. Seguiu-se lavagem três vezes com PBS-T e adicionados 100 μL do substrato TMB (KPL, Wembley, Middlesex, UK); as placas foram mantidas no escuro para revelação. A reação foi interrompida com 50 μL/poço de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,2 M e a leitura realizada a 450 nm utilizando o leitor de microplacas MRX II (Dynex, Worthing, West Sussex, UK). Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.10 Recrutamento de células do sistema imune para os linfonodos drenantes após administração subcutânea da sílica

A caracterização dos tipos celulares presentes nos linfonodos drenantes após administração de SBA-15 foi realizada por citometria de fluxo **(Figura suplementar 1)**. Camundongos C57BL/6 machos (n= 3 por grupo) receberam, no coxim plantar traseiro direito (s.c.), 1000 µg de SBA-15 em 50 µL de PBS ou PBS como controle e, após 24 e 72 horas, os linfonodos poplíteos foram retirados e digeridos em 1 mg/mL de colagenase D (Sigma-Aldrich Biotechnology Co., St. Louis, MO, EUA) em meio HBSS (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para o isolamento das células. As células foram devidamente marcadas com os anticorpos específicos para CD19, CD4, CD8, CD11b, CD11c, F4/80 e MHCII para posterior analise fenotípica, seguindo o protocolo descrito no item 3.11 – *Citometria de fluxo*.

Determinou-se, nesses períodos, o número total de células, os tipos celulares presentes nos linfonodos (porcentagem e número total) e a espessura da pata inoculada, calculada a partir da diferença entre as espessuras da pata injetada (direita traseira) e a pata contra lateral (esquerda traseira), expressa em milímetros.

3.11 Citometria de fluxo

Células recuperadas de cultura ou tecidos linfoides foram analisadas por citometria de fluxo quanto às moléculas expressas em sua superfície e a produção

de citocinas. Inicialmente, as células foram lavadas em tampão FACS (PBS com $Ca^{2+}Mg^{2+}$; 4% SFB) (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), centrifugou-se as amostras a 400 x g por 5 minutos a 4° C e ressuspendeu-se a 1-5 $x10^6$ células por tubo. Tubos de poliestireno de 5 mL de fundo redondo foram utilizados para as marcações (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA). As células receberam anti-CD16/CD32 (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) na diluição 1: 200 em tampão FACS, volume final de 200 µL, por 20 minutos a 4 °C, para bloqueio de ligações não-específicas. Em seguida, as células foram lavadas e marcadas (30 minutos, a 4 °C, no escuro) com anticorpos conjugados específicos para os diferentes marcadores celulares e de citocinas, bem como os isótipos controle apropriados, na diluição 1: 200 em 200 µL de tampão FACS **(Quadro 1)**. Depois de lavar, centrifugar e descartar o sobrenadante adicionou-se, a cada tubo, 10 µL do marcador de morte celular 7- aminoactinomicina D (7-AAD-PerCP) (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) 5 minutos antes da aquisição no citômetro de fluxo. As aquisições procederam-se nos citômetros LSRII (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) ou CyAn (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, EUA) e os dados gerados foram analisados com o software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA).

Quadro 1- Anticorpos monoclonais utilizados nos experimentos de Citometria de fluxo.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Isótipo	Fabricante
CD3	PE, APC-Cy7	17A2	Rat IgG2b	BD Bioscience
CD4	PE	GK1.5	Rat IgG2a	BD Bioscience
CD8α	PE, Qdot Bv605	53-6.7	Rat IgG2a	BD Bioscience
CD11b	AF700	M1/70	Rat IgG2b	BD Bioscience
CD11c	PE-Cy7	N418	Hamster IgG1	eBioscience
CD16/32	-	2.4G2	Rat IgG2b	BD Bioscience
CD19	PE, V450	1D3	Rat IgG2a	BD Bioscience
CD40	APC	3/23	Rat IgG2a	BD Bioscience
CD45.1	APC	30-F11	Rat IgG2b	eBioscience
CD80	FITC	16-10A1	Arm Hamster IgG2	BD Bioscience
CD86	PE	GL1	Rat IgG2a	BD Bioscience
F4/80	APC	BM8	Rat IgG2a	eBioscience
MHCII (I-A/I-E)	V450, PerCP-Cy5.5	M5/114.15.2	Rat IgG2b	eBioscience
IL-6	PE	MP5-20F3	Rat IgG1	BD Bioscience
IFN-γ	APC	XMG1.2	Rat IgG1	BD Bioscience

3.12 Análise da produção de citocinas intracelulares

A análise intracelular das citocinas IFN-γ e IL-6 procedeu-se com o tratamento das células de interesse (5 x 10^6 células) com monensina (1 µM) e Brefeldina A (10 µg/mL) (Sigma-Aldrich Biotechnology Co., St. Louis, MO, EUA) por 4,5 horas a 37 °C, para impedir a secreção das citocinas produzidas através do bloqueio do Complexo de Golgi. As células foram recuperadas, lavadas em PBS e centrifugadas (400 x g, 5 minutos, 4 °C) adicionando-se, em seguida, o marcador de morte celular *Aquadye* fluorocromo V500 (Invitrogen, Eugene, OR, EUA) na diluição 1:1000 e incubando por 30 minutos, 4 °C, no escuro. Prosseguiu-se com lavagens em PBS, seguidas de centrifugação (400 x g, 5 minutos, 4 °C) e da adição de anti-CD16/CD32 (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA), diluído 1:200 em PBS. As amostras foram incubadas por 20 minutos, 4 °C, no escuro e novamente lavadas em PBS. Procedeu-se a marcação das moléculas de superfície celular utilizando anticorpos específicos, por 30 minutos, 4 °C, no escuro. Após lavagem em PBS, as células foram fixadas em formaldeído 4% (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, EUA) por 5 minutos a temperatura ambiente, lavadas em tampão FACS e, em seguida, em tampão *Perm Wash* (PBS, 0,1% NaN_3, 0,1% BSA, 1% SFB, 0,1% saponina). Adicionou-se, novamente, anti-CD16/CD32 nas amostras e, passados 20 minutos de incubação, procedeu-se a marcação das citocinas intracelulares, utilizando os anticorpos específicos para as citocinas de interesse **(Quadro 1)**.

Como controle, foram usados isótipos dos fluorocromos presentes no painel de marcação intracelular. Após 1 hora de incubação, 4 °C, no escuro, as células foram lavadas em *Perm Wash* e em tampão FACS. As aquisições procederam-se nos citômetros LSRII (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) ou CyAn (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, EUA) e os dados gerados foram analisados com o software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA).

3.13 Avaliação *in vitro* do efeito da SBA-15 na ativação de células dendríticas diferenciadas da medula óssea de camundongos C57BL/6

3.13.1 Obtenção e geração das DC

Células da medula óssea foram extraídas dos fêmures e tíbias de camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6, através de consecutivas lavagens utilizando-se seringa, agulha hipodérmica e meio RPMI completo (10% SFB, 2 mM de L-glutamina, 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, 1,25 µg/mL de fungizona e 1 µL/mL de β-mercaptoetanol 50 µM) (Gibco, Grand Island, NY, EUA). Após centrifugação a 400 x g por 5 minutos, as células (5 x 10^6) foram cultivadas em placas de Petri por sete dias em volume total de 10 mL de meio completo contendo 1 µL de GM-CSF (100 µg/mL) (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA) a 37 °C, 5% CO_2. Após três dias de cultura, adicionou-se 10 mL de meio RPMI completo e 1 µL de GM-CSF. Após o período de incubação, as células dendríticas diferenciadas da medula óssea (BMDC) foram utilizadas nos ensaios.

3.13.2 Ativação in vitro das BMDC pela SBA-15

Para avaliar o efeito da SBA-15 nas BMDC, células (1x10^6) foram cultivadas, em placas de 24 poços de baixa aderência (Costar 3473, Ultra Low Cluster Plate, Corning Incorporated, New York, NY, EUA), contendo 1 mL dos diferentes tratamentos: meio RPMI completo; 100 ng/mL de LPS (Sigma–Aldrich Biotechnology Co., St. Louis, MO, EUA) em meio RPMI completo; 50, 250, 500, 1000 e 5000 µg/mL de SBA-15 em meio RPMI completo. Após 6 horas, as células foram recuperadas e avaliadas por citometria de fluxo quanto a expressão das moléculas de superfície CD11c (PE-Cy7), MHCII (V450), CD40 (APC), CD80 (FITC), CD86 (PE), além do marcador de morte celular 7-AAD (PerCP) e IL-6 intracelular (PE). Os isótipos referentes a cada fluorocromo foram utilizados como controle. Células $CD11c^{+}MHCII^{high}$ foram selecionadas para a análise, após excluir-se *doublets* e células mortas **(Figura suplementar 2)**.

Para observar a fagocitose e o efeito da SBA-15 na morfologia celular, lâminas de vidro contendo 5 x 10^4 BMDC oriundas dos diferentes tratamentos, em

volume final de 200 µL de PBS, foram obtidas por citocentrifugação (400 x g por 5 minutos, velocidade média) e posteriormente coradas com hematoxilina-eosina (HE).

3.14 Ensaio de fagocitose com BMDC e OVA marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC)

Para avaliar a capacidade da SBA-15 de facilitar a fagocitose de proteínas solúveis, como a OVA, cultivou-se 5 x 10^5 BMDC de camundongos C57BL/6, com 5 µg/mL de OVA marcada com FITC (Invitrogen, Eugene, OR, EUA), na presença ou não de SBA-15 (125 µg/mL) em volume final de 1 mL de meio RPMI completo, por 2 horas a 37 °C, 5% CO_2. Após incubação, procederam-se lavagens consecutivas para eliminar a proteína e sílica excedentes. Em seguida, as células foram marcadas com anti-CD11c (APC), anti-MHCII (V450) e com o marcador de morte celular 7-AAD (PerCP), conforme descrito no item 3.6 - *Citometria de fluxo*. A expressão de OVA-FITC foi avaliada nos diferentes tratamentos por citometria de fluxo.

Para visualizar a fagocitose da OVA-FITC, lâminas de vidro contendo 5 x 10^4 células em 200 µL de PBS, oriundas dos diferentes tratamentos, foram obtidas por citocentrifugação (400 x g por 5 minutos, velocidade média). Após secagem a temperatura ambiente, as lâminas foram mergulhadas em acetona gelada por 10 minutos e mantidas no escuro. Em seguida, mergulhadas em PBS por 10 minutos e, após secagem, uma gota de *Vectashield mounting media* com DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), para coloração dos núcleos celulares, foi adicionada em cada amostra. As lâminas foram visualizadas em microscópio confocal Apotome Imager.ZI e as imagens adquiridas pela câmera digital Carl Zeiss AxioCam MRm e visualizadas com o software Axiovision versão 4.7.2.

3.15 SBA-15 na apresentação antigênica *in vitro*

Para avaliar o papel da SBA-15 na apresentação antigênica e ativação *in vitro* de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, foram realizados experimentos de cocultura com BMDC tratadas por 2 horas com OVA (20 µg/mL), OVA: SBA-15 (20 µg/mL: 500 µg/mL), peptídeos $OVA_{257-264}$ ou $OVA_{323-339}$ (1 µg/mL) encapsulados ou não a SBA-15 (1 µg/mL dos peptídeos: 25 µg/mL da sílica) (Genway Biotech, San Diego, CA, EUA), e linfócitos de camundongos das linhagens OT-I ou OT-II. Em microplacas de

96 poços, 5 x 10^4 BMDC previamente tratadas foram adicionadas aos primeiros poços e, em seguida, diluídas em série. Adicionou-se, em todos os poços, 10 x 10^4 células isoladas dos linfonodos periféricos de animais OT-I ou OT-II e timidina ([^{3}H]TdR-1µCi/poço) (West of Scotland Radionucleotide Dispensary, Glasgow, Reino Unido), em volume final de 200 µL de meio RPMI completo por poço.

O protocolo inicial consistia na marcação dos linfócitos OT-I ou OT-II com 5 µM/mL de 5,6-carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE - 5 µM; 1 x 10^7 células/mL; 8 minutos, escuro, temperatura ambiente) (Invitrogen, Eugene, OR, EUA), incubação por 3 dias de BMDC e linfócitos T nas proporções 1: 2, 1: 5 e 1: 10 respectivamente, e posterior análise da diluição do CFSE por citometria de fluxo, conforme visto em alguns resultados. Entretanto, após padronização, optou-se pelo uso da timidina e da diluição seriada de DC para a maioria dos experimentos. Avaliou-se, após três dias, a proliferação de linfócitos por absorção de timidina bem como a produção de IFN-γ por essas células, através de marcação intracelular dessa citocina por citometria de fluxo (conforme item 3.7 - *Análise da produção de citocinas intracelulares*). Para quantificação de IFN-γ (APC), utilizou-se os marcadores de superfície celular anti-CD4 ou anti-CD8 (ambos em PE), excluindo-se *doublets* e células mortas com o uso do marcador de viabilidade celular, *Aquadye* fluorocromo V500 **(Figura suplementar 3)**.

3.16 A SBA-15 na apresentação antigênica *in vivo*

Linfonodos e baços de camundongos das linhagens OT-I e OT-II foram coletados e as células isoladas. Após lise das hemácias com tampão específico (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA), as células foram marcadas com CFSE. Essas células expressavam CD45.1 (Ly5.1) em sua superfície, permitindo sua identificação após transferência para camundongos WT C57BL/6 CD45.2 (Ly5.2). Após marcação com CFSE, 5 x 10^6 células foram injetadas (i.v.) nos camundongos recipientes (n= 4 por grupo). Um dia após a transferência, os recipientes foram imunizados no coxim plantar direito (s.c.) com 10 µg/mL OVA, 10 µg/mL OVA: 250 µg/mL SBA-15 ou injetados com PBS, em volume final de 50 µL por animal. Após quatro dias, os linfonodos poplíteos foram retirados e foi avaliada a proliferação dos linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ (PE) OVA-específicos, através da diluição de CFSE por citometria de fluxo **(Figura suplementar 4)**. Ainda, determinou-se o número total de células nos

linfonodos após imunização, a porcentagem de células provenientes dos animais doadores utilizando o marcador anti-CD45.1^{+} (APC) e a porcentagem de células CD45.1^{+} em divisão.

3.17 SBA-15 na ativação de linfócitos CTL *in vivo*

O desempenho da sílica na ativação de linfócitos CTL foi analisado por ensaio de citotoxicidade, avaliando-se a morte de células-alvo do baço de camundongos C57BL/6 marcadas CFSE^{low} (0,5 µM) e CFSE^{high} (5 µM) **(Figura suplementar 5)**, essas últimas, tratadas por 2 horas a 37 °C, 5% CO_2 com o peptídeo $OVA_{257-264}$ (3 µM). As células marcadas foram injetadas na proporção 1:1 (5 x 10^6 de cada, i.v.) em camundongos recipientes WT C57BL/6 (n= 3 por grupo) imunizados 7 dias antes, no coxim plantar (s.c.), com 100 µg de OVA, 100 µg de OVA: 2500 µg SBA-15, 100 µg de OVA: 2000 µg CFA e, como grupo controle, em animais não imunizados. Após 24 horas, baço e linfonodos periféricos dos animais tratados foram retirados e a morte de células CFSE^{high} por CTL foi avaliada nos diferentes grupos, por citometria de fluxo, através da análise da perda de CFSE.

3.18 Análise estatísticas

Os resultados foram expressos como: média (x) e desvio padrão (SD) e estatisticamente analisados pelo teste paramétrico *t* de Student ou Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni, calculados pelo software GraphPad Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, EUA) e considerados significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Estudo do potencial adjuvante da sílica SBA-15 em imunizações com a vacina contra hepatite B

Demonstrou-se a aplicabilidade da sílica do tipo SBA-15 como adjuvante nas imunizações com a proteína recombinante HBsAg do vírus da hepatite B, principal componente da vacina Butang®, produzida pelo Instituto Butantan **(Figura 2)**. Camundongos BALB/c receberam, pelas vias oral ou subcutânea, 0,5 µg de HBsAg em sílica ou adsorvida ao $Al(OH)_3$.

Figura 2– Proteína recombinante do vírus HBV e a sílica mesoporosa nanoestruturada SBA-15.

A

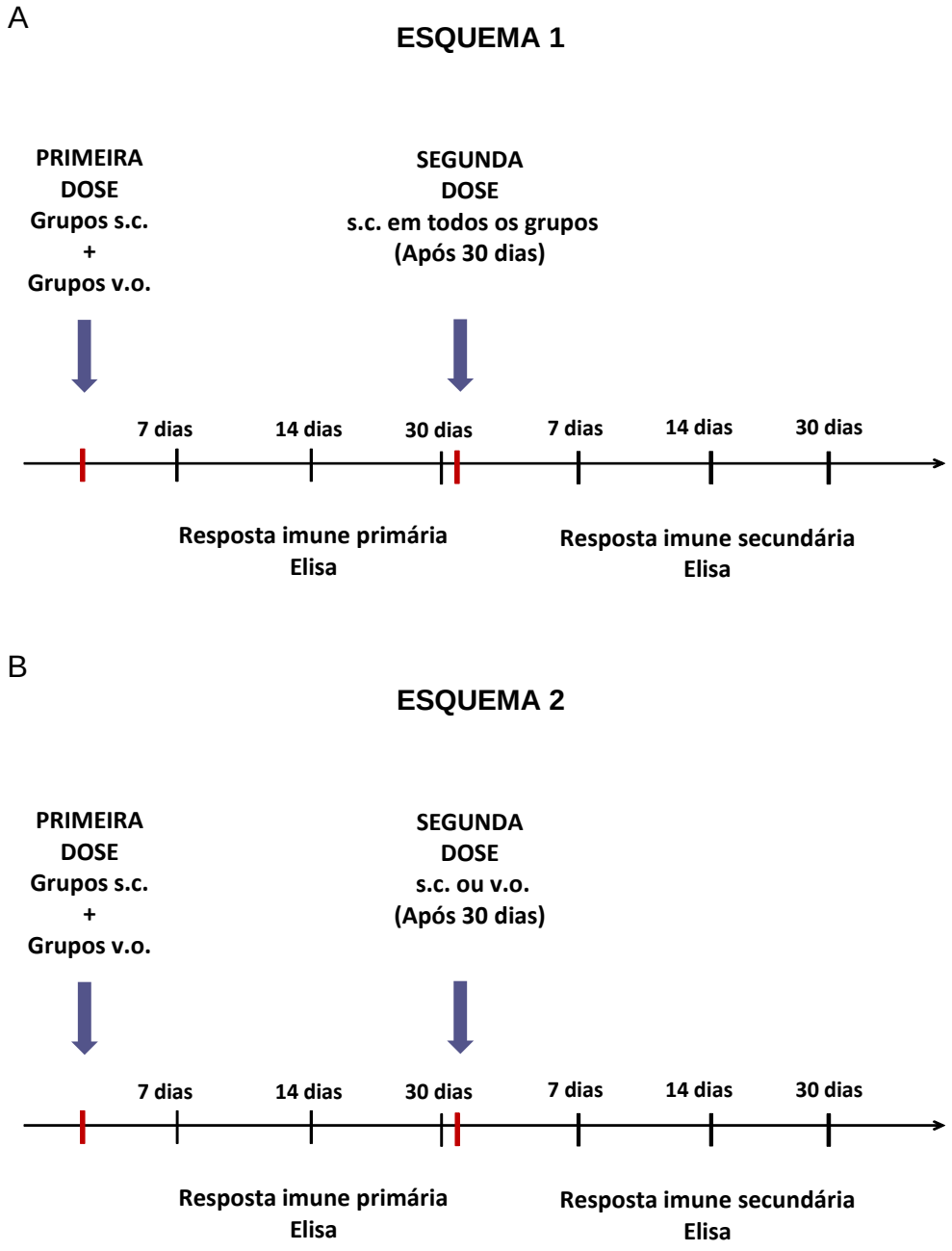
(A) Partículas da proteína recombinante HBsAg. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das *Virus Like Particles* na ausência de sílica. **(B)** Proteína recombinante HBsAg ligada à SBA-15. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das *Virus Like Particles* na presença de sílica. Imagens cedidas pela Seção de Hepatite do Instituto Butantan.

O primeiro protocolo avaliado **(Esquema 1)** visava estimar a resposta imune secundária de camundongos imunizados com HBsAg em sílica ou $Al(OH)_3$, pelas vias oral ou subcutânea. Especialmente, verificar se houve o desenvolvimento de resposta imune após uma única dose oral. Para isso, uma dose reforço foi administrada subcutaneamente, 30 dias após a primeira imunização. Utilizou-se, no reforço, HBsAg em sílica ou $Al(OH)_3$, mantendo os adjuvantes referentes aos grupos da primeira imunização **(Figura 3A)**.

Em outro experimento **(Esquema 2)**, foi administrado o antígeno pelas vias oral ou subcutânea e dose reforço 30 dias após a primeira administração, mantendo-se as vias da imunização primária. Esse estudo teve como objetivo principal comparar a resposta imune gerada após administração pelas vias parenteral ou oral **(Figura 3B)**.

Amostras individuais de soro e fezes foram coletadas periodicamente para titulação de anticorpos específicos por ELISA.

Figura 3- Esquema das imunizações com HBsAg.



(A) Camundongos BALB/c foram imunizados com 0,5 µg de HBsAg, 0,5 µg de HBsAg: 5 µg SBA-15 ou 0,5 µg de HBsAg: 6,25 µg $Al(OH)_3$ pelas vias subcutânea ou oral. Uma dose reforço foi administrada, após 30 dias, exclusivamente pela via subcutânea com a mesma dose do antígeno em sílica ou $Al(OH)_3$. **(B)** Camundongos BALB/c foram imunizados com 0,5 µg de HBsAg, 0,5 µg de HBsAg: 5 µg SBA-15 ou 0,5 µg de HBsAg: 6,25 µg $Al(OH)_3$ pelas vias subcutânea ou oral. Uma dose reforço foi administrada, após 30 dias, pelas mesmas vias e com a mesma dose do antígeno em sílica ou $Al(OH)_3$. Passados 7, 14 e 30 dias das imunizações, amostras de sangue e fezes foram coletadas para detecção de anticorpos anti-HBsAg por ELISA. n= 5 animais por grupo.

4.1.1 Efeito da SBA-15 na produção de anticorpos séricos (IgA, IgG, IgG1 e IgG2a) e secretados (s-IgA) anti-HBsAg nas imunizações parenteral e oral

Para análise da produção de anticorpos específicos séricos e secretados, sangrias e coleta de fezes foram realizadas periodicamente para obtenção de amostras dos camundongos testados. Tanto no **Esquema 1** quanto no **Esquema 2**, passados 7, 14 e 30 dias da primeira imunização não foi detectada a produção de anticorpos específicos em nenhum dos grupos experimentais (dados não mostrados).

No **Esquema 1**, após imunização oral ou subcutânea, e dose reforço exclusivamente s.c., os níveis de IgG sérica anti-HBsAg foram elevados, passados 7, 14 e 30 dias, tanto nos grupos imunizados com SBA-15 (5,2 $\log_2$, 7,8 $\log_2$ e 9 $\log_2$) quanto com $Al(OH)_3$ (11 $\log_2$, 11$\log_2$ e 9,6 $\log_2$). Detectou-se diferença estatística ($p < 0,05$) no 7º. dia após reforço, evidenciando a maior produção de anticorpos no grupo imunizado s.c. com $Al(OH)_3$ **(Figura 4A)**.

A análise dos isótipos IgG1 e IgG2a, na resposta secundária, indicou diferença nos níveis de IgG1 entre os grupos HBsAg: $Al(OH)_3$ (10,2 $\log_2$, 12,5 $\log_2$ e 12 $\log_2$) e HBsAg: SBA-15 (7,4 $\log_2$, 10,4 $\log_2$ e 9 $\log_2$). Novamente, 7 dias após a segunda imunização subcutânea, o grupo imunizado com $Al(OH)_3$ apresentou maior produção desse isótipo ($p < 0,05$) comparativamente ao grupo imunizado com SBA-15 **(Figuras 4B e 5)**. Os títulos de IgG2a mostraram-se semelhantes entre os grupos HBsAg: $Al(OH)_3$ (8 $\log_2$, 8,5 $\log_2$ e 7,8 $\log_2$) e HBsAg: SBA-15 (5,8 $\log_2$, 6,6 $\log_2$ e 6,8 $\log_2$) **(Figuras 4C e 5)**.

Para avaliar o uso da SBA-15 como adjuvante nas imunizações pela via oral nesse esquema, imunizamos camundongos BALB/c com HBsAg em PBS ou HBsAg: SBA-15 por gavagem. Após a primeira dose não se detectou a produção de anticorpos séricos ou secretados específicos nos grupos experimentais (dados não mostrados).

O soro coletado 7, 14 e 30 dias após dose reforço, pela via subcutânea, indicou que os camundongos imunizados sem a sílica não produziram anticorpos específicos; o contrário foi observado no grupo HBsAg: SBA-15. O grupo apresentou títulos de IgG de 9,2 $\log_2$, 10,6 $\log_2$ e 10 $\log_2$, nos dias 7, 14 e 30 após reforço, respectivamente. Houve diferença estatística no 30º. dia comparativamente ao 7º. dia ($p < 0,05$) **(Figura 4A)**. Os níveis de IgG1 anti-HBsAg detectados foram de 9

log_2, 10,2 log_2 e 10 log_2; e os de IgG2a sérica foram de 6 log_2, 6,2 log_2 e 7,4 log_2 no grupo imunizado com a sílica **(Figura 6)**.

Anticorpos IgA séricos específicos foram detectados somente no grupo HBsAg: SBA-15, 10 dias após reforço subcutâneo (4,5 log_2) **(Figura 7A)**.

As análises de IgA secretada (s-IgA) nas fezes, mostraram que os títulos de anticorpos do grupo primado pela via oral com HBsAg em SBA-15 foram maiores comparativamente ao grupo imunizado sem a sílica. Dez dias após a primeira imunização oral, os títulos de s-IgA foram 3 log_2 no grupo HBsAg:SBA-15 e mantiveram-se estáveis após reforço subcutâneo **(Figura 7B)**.

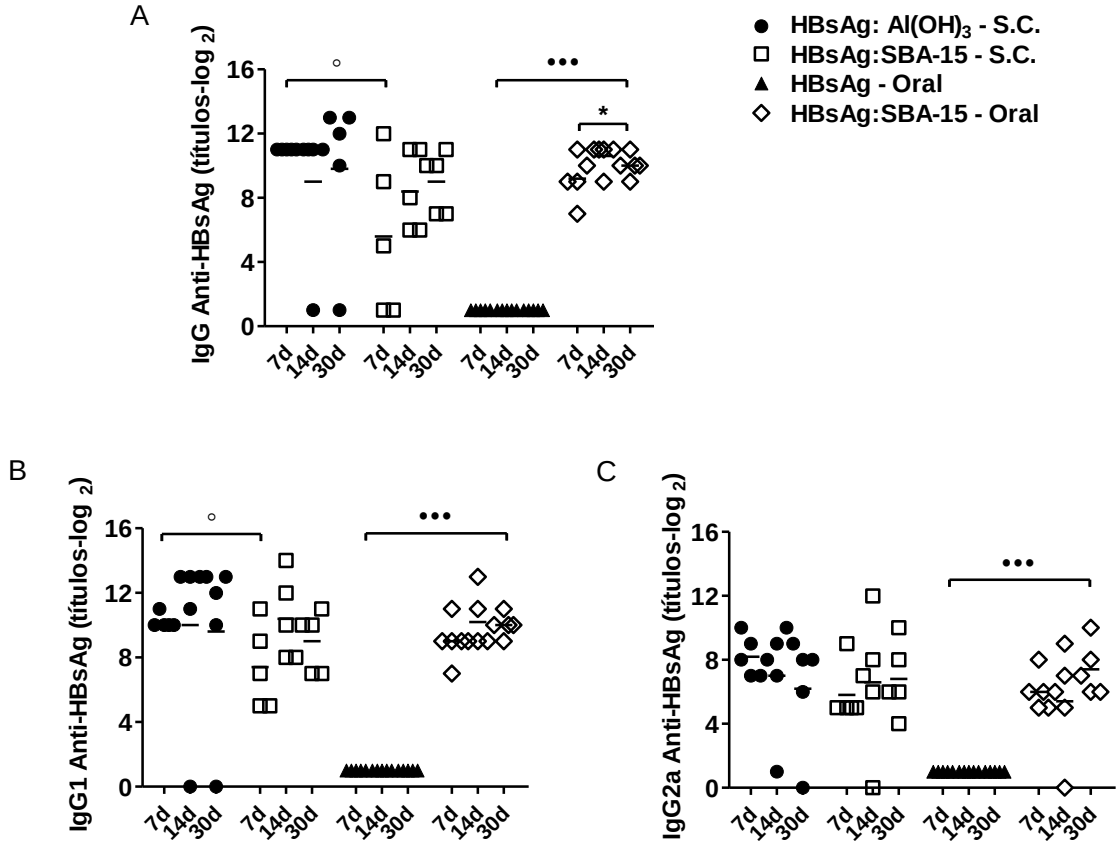
No **Esquema 2**, cujo objetivo era comparar as vias de imunização parenteral e oral, não detectou-se diferença na produção de anticorpos da classe IgG após 14 dias da imunização subcutânea com $Al(OH)_3$ (> 11 log_2 em todos os animais do grupo) ou SBA-15 (> 11 log_2, 8 log_2, 6 log_2, 6 log_2 e 11 log_2) indicando que os dois adjuvantes foram igualmente eficientes **(Figura 8)**.

Ainda, após imunização oral, a sílica mostrou-se um bom adjuvante para a resposta de anticorpos. Os títulos de IgG (> 11 log_2, 9 log_2, 11 log_2, 11 log_2 e 13 log_2), IgG1 (13 log_2, 9 log_2, 9 log_2, 11 log_2 e 9 log_2) e IgG2a (9 log_2, 2 log_2, 5 log_2, 6 log_2 e 7 log_2) foram significativamente maiores ($p < 0,001$) no grupo imunizado com HBsAg:SBA-15. No grupo imunizado com HBsAg em PBS não foram detectados anticorpos específicos para a proteína **(Figura 8)**.

Surpreendentemente, os títulos obtidos por camundongos imunizados pela via subcutânea, com o antígeno em sílica ou $Al(OH)_3$, mostraram-se semelhantes aos dos animais imunizados pela via oral com a sílica **(Figuras 4, 6 e 8)**.

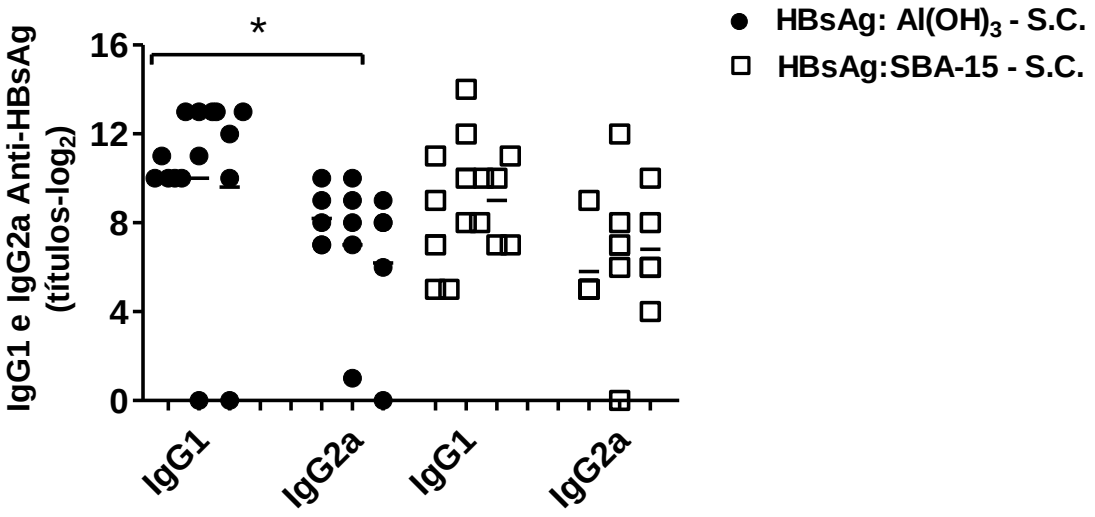
Verificou-se que camundongos imunizados pela via subcutânea com HBsAg em PBS apresentaram altos títulos de anticorpos. Entretanto, o mesmo não ocorreu pela via oral, indicando o potencial adjuvante da sílica, especialmente por essa via **(Figuras 4, 6 e 8)**.

Figura 4- Produção de anticorpos anti-HBsAg em camundongos BALB/c imunizados pelas vias subcutânea ou oral (Esquema 1).



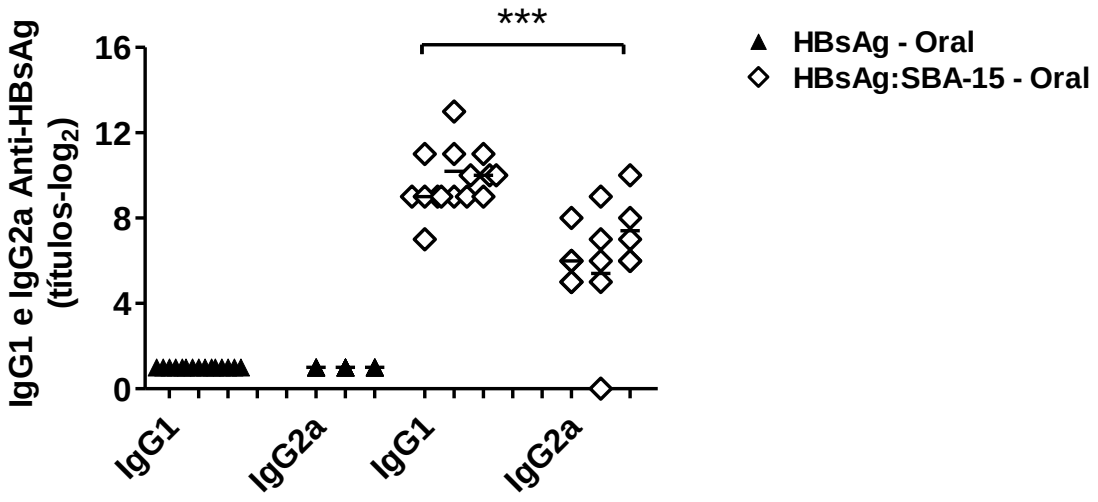
Níveis séricos de **(A)** IgG, **(B)** IgG1, **(C)** IgG2a anti-HBsAg. Níveis de anticorpos medidos por ELISA 7, 14 e 30 dias após dose reforço, administrada pela via subcutânea 30 dias após a primeira dose (oral ou s.c.). Análises estatísticas feitas pelo teste paramétrico *t* de Student, $^{*}p < 0{,}05$ (7d *versus* 30d), ° $p < 0{,}05$ (HBsAg: $Al(OH)_3$ *versus* HBsAg: SBA-15 – s.c.), $^{\bullet\bullet\bullet}p < 0{,}001$ (HBsAg: $Al(OH)_3$ *versus* HBsAg: SBA-15 – v.o.). n= 5 animais por grupo.

Figura 5- Produção de IgG1 e IgG2a anti-HBsAg em camundongos BALB/c imunizados pela via subcutânea, seguindo o esquema 1 de imunização.



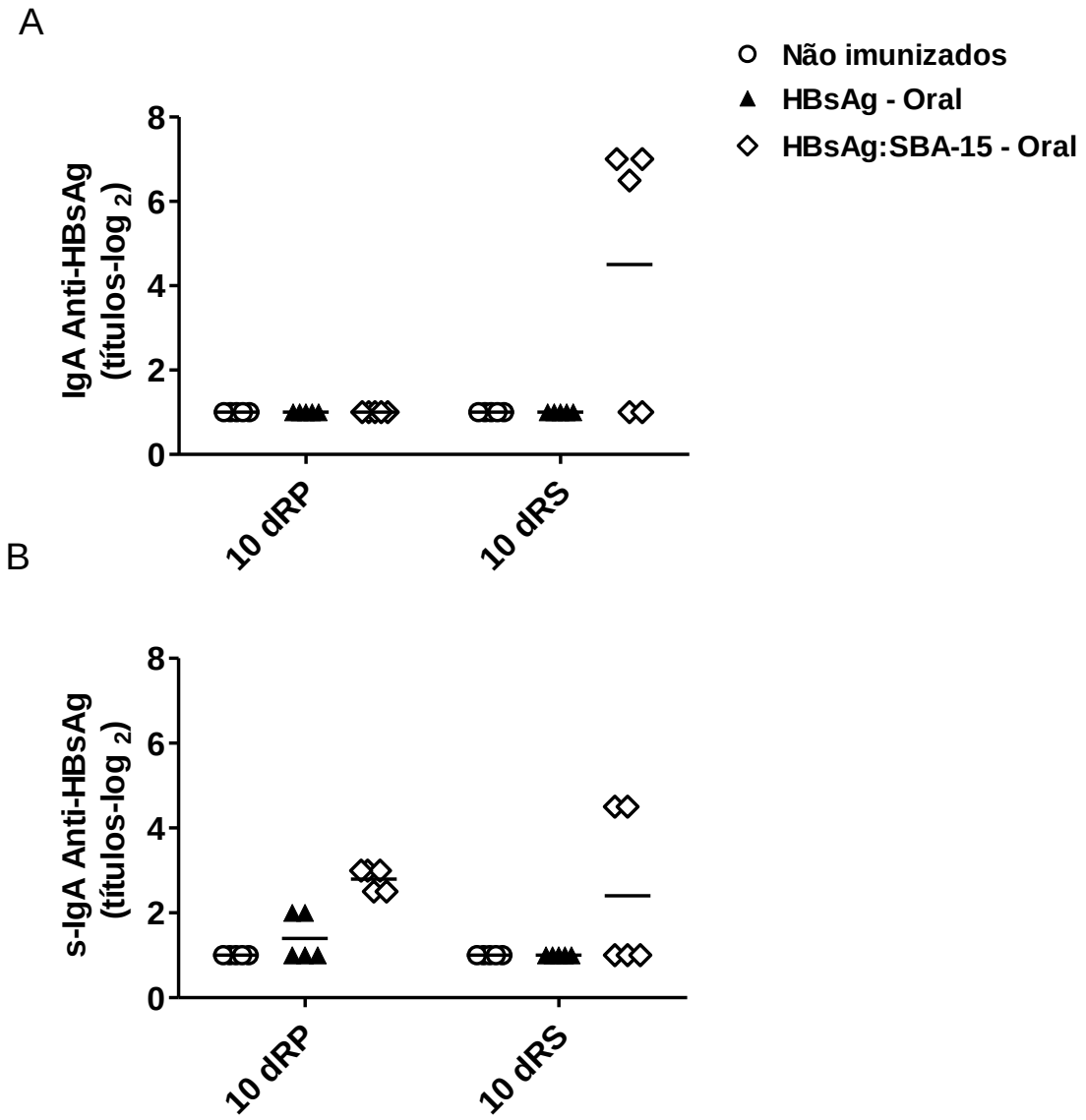
Níveis séricos de IgG1 e IgG2a anti-HBsAg. Níveis de anticorpos medidos por ELISA 7, 14 e 30 dias após dose reforço, administrada pela via subcutânea 30 dias após a primeira dose. Os títulos de IgG1 e IgG2a entre os grupos foram usados como referência para o teste paramétrico *t* de Student, $^{*}p < 0,05$. n= 5 animais por grupo.

Figura 6- Produção de IgG1 e IgG2a anti-HBsAg em camundongos BALB/c imunizados pela via oral (Esquema 1).



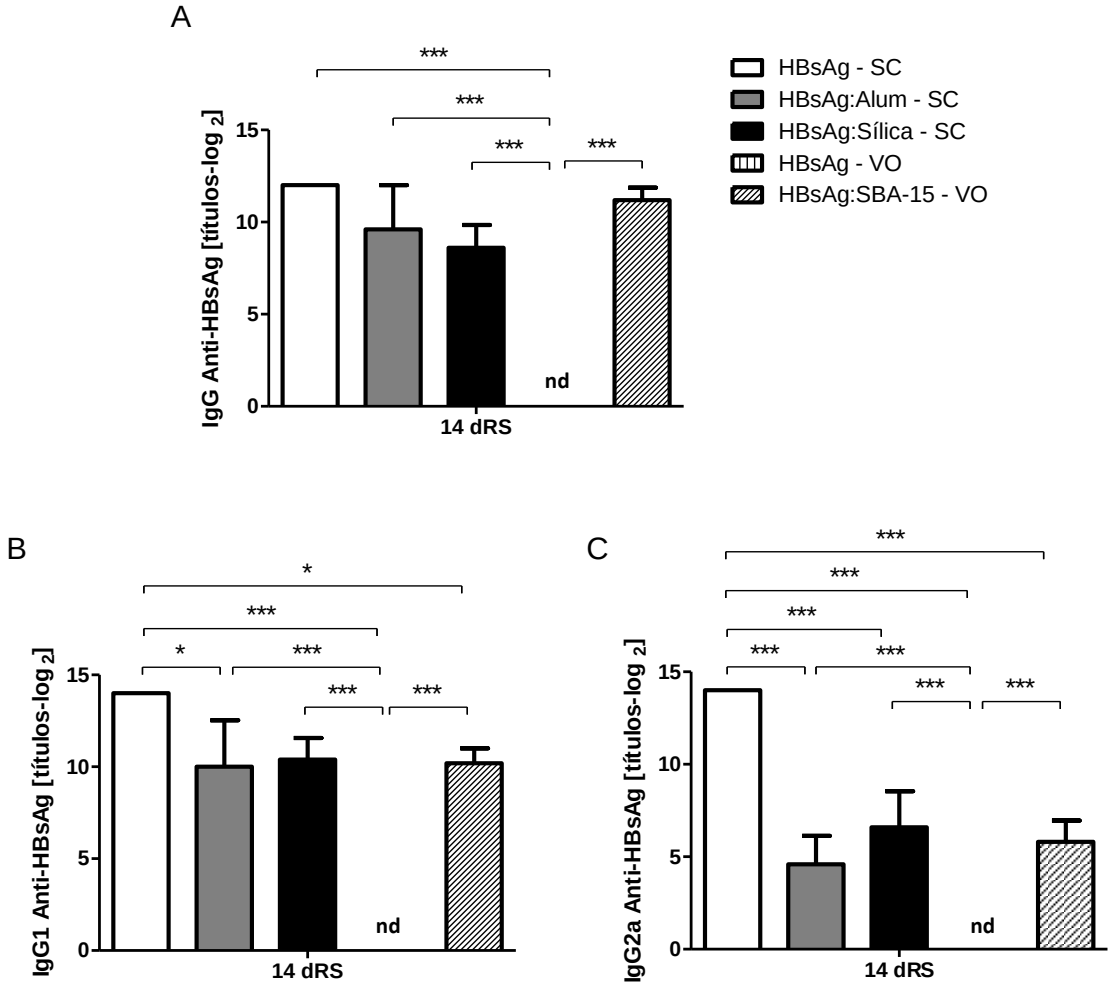
Níveis séricos de IgG1 e IgG2a anti-HBsAg. Níveis de anticorpos medidos por ELISA 7, 14 e 30 dias após dose reforço, administrada pela via subcutânea 30 dias após a primeira dose oral. Os títulos de IgG1 e IgG2a entre os grupos foram usados como referência para o teste paramétrico *t* de Student, $^{***}p < 0{,}001$. n= 5 animais por grupo.

Figura 7- Produção de IgA sérica e secretada (s-IgA) anti-HBsAg em camundongos BALB/c imunizados pela via oral (Esquema 1).



(A) Níveis séricos e **(B)** secretados de IgA anti-HBsAg. Níveis de anticorpos medidos por ELISA 10 dias (dRP) após imunização pela via oral e 10 dias (dRS) após reforço subcutâneo administrada 30 dias após a primeira dose. O grupo de animais imunizado com a HBsAg em PBS pela via oral foi usado como referência para as análises estatísticas feitas pelo teste paramétrico *t* de Student. n= 5 animais por grupo.

Figura 8- Produção de IgG, IgG1 e IgG2a anti-HBsAg em camundongos BALB/c imunizados pelas vias subcutânea ou oral (Esquema 2).



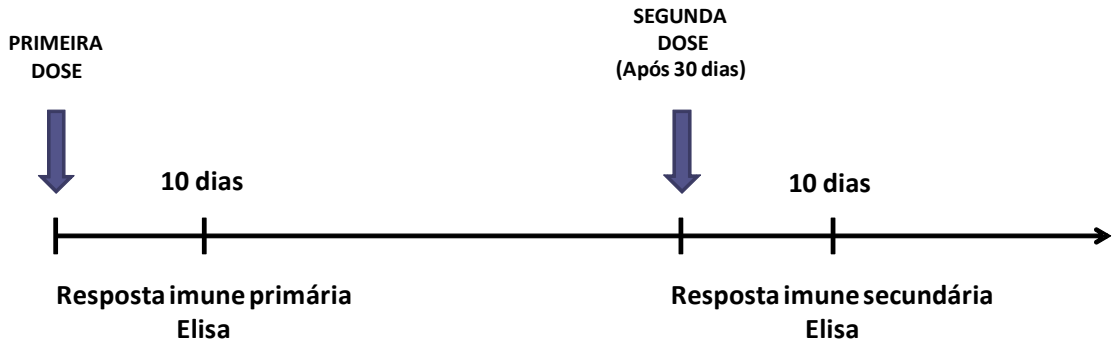
Camundongos BALB/c imunizados com 0,5 µg de HBsAg, 0,5 µg de HBsAg: 5 µg SBA-15 ou 0,5 µg de HBsAg: 6,25 $Al(OH)_3$ pelas vias subcutânea ou oral. Dose reforço administrada após 30 dias pelas vias subcutânea ou oral com a mesma dose do antígeno em PBS, sílica ou $Al(OH)_3$. Passados 14 dias da segunda imunização, amostras de sangue foram coletadas para detecção de anticorpos anti-HBsAg por ELISA. **(A)** Títulos de IgG, **(B)** IgG1 e **(C)** IgG2a. Análises estatísticas feitas pelo teste Two-way ANOVA e Bonferroni pós-teste, $^{*}p < 0{,}05$; $^{**}p < 0{,}01$; $^{***}p < 0{,}001$. n= 5 animais por grupo; nd = não detectado.

4.2 Estudo do potencial adjuvante da sílica SBA-15 em imunizações parenteral e oral com ovalbumina

4.2.1 Efeito da SBA-15 na produção de anticorpos séricos IgG anti-OVA em imunizações subcutâneas

Avaliou-se o desenvolvimento da resposta humoral em camundongos C57BL/6 imunizados pela via subcutânea utilizando a sílica SBA-15 como adjuvante. Os animais foram imunizados, por duas vezes, com intervalos de 30 dias, com 10 µg de OVA ou 10 µg de OVA: 250 µg SBA-15. A presença de IgG sérica anti-OVA foi avaliada 10 dias após as imunizações **(Figura 9)**.

Figura 9- Esquema das imunizações com SBA-15 pela via subcutânea.

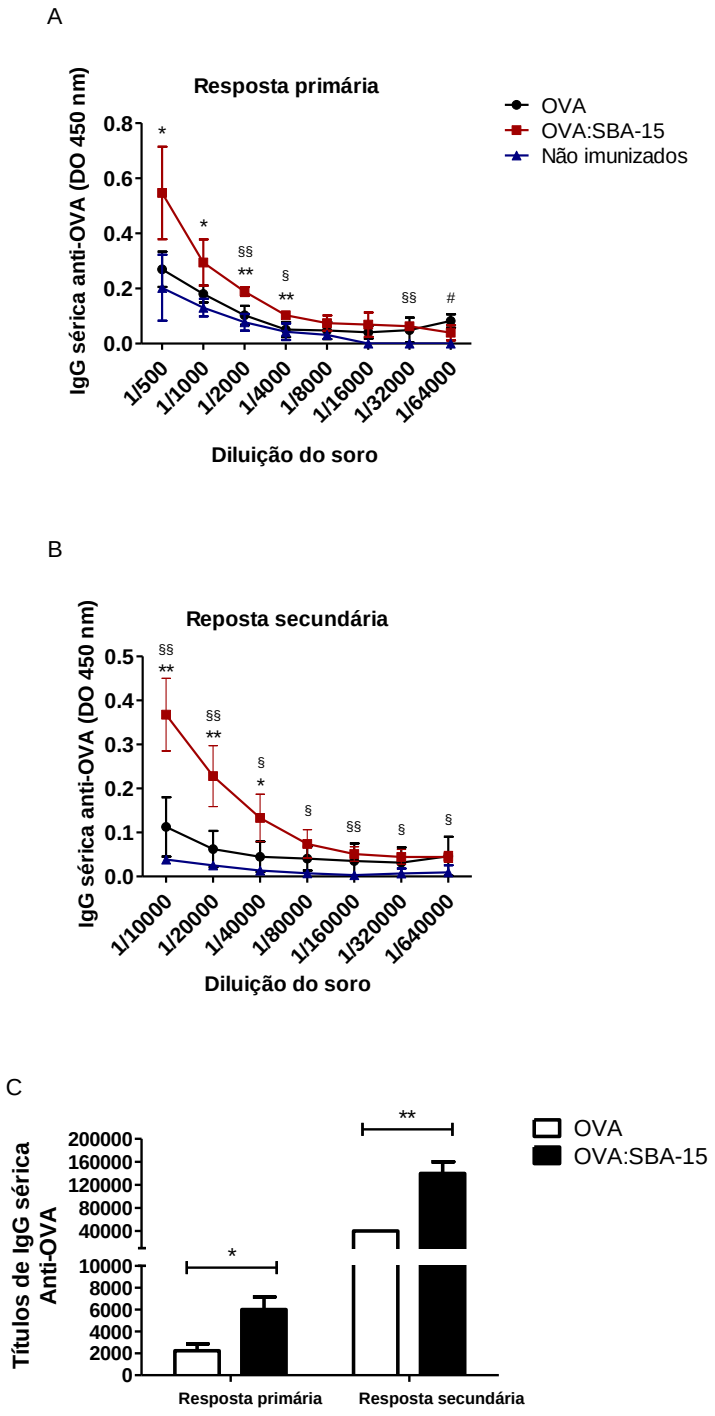


Camundongos C57BL/6 (n= 4 por grupo) foram imunizados com 10 µg de OVA ou 10 µg de OVA: 250 µg SBA-15 por duas vezes, com intervalos de 30 dias entre as imunizações. Dez dias após as inoculações, os animais foram sangrados pela base da cauda para a obtenção de soro. A presença de anticorpos IgG anti-OVA foi avaliada por ELISA.

Os resultados das imunizações subcutâneas revelaram aumento nos títulos de anticorpos séricos IgG anti-OVA no grupo imunizado com a sílica, tanto na resposta primária quanto na secundária **(Figura 10)**. Na resposta primária, o grupo imunizado com SBA-15 apresentou título 1: 6000 contra 1: 2250 do grupo imunizado sem o adjuvante ($p < 0,05$) **(Figuras 10A e 10C)**.

Os títulos aumentaram após a dose reforço e o grupo OVA apresentou título 1: 40000, já o grupo OVA: SBA-15 teve título 1: 147500 ($p < 0,01$) **(Figuras 10B e 10C)**. Esses resultados comprovam o potencial adjuvante da sílica e sua eficiência na indução de memória imunológica devido ao aumento nos níveis de anticorpos na resposta secundária.

Figura 10- Títulos de IgG anti-OVA produzidos por camundongos C57BL/6 imunizados pela via subcutânea.

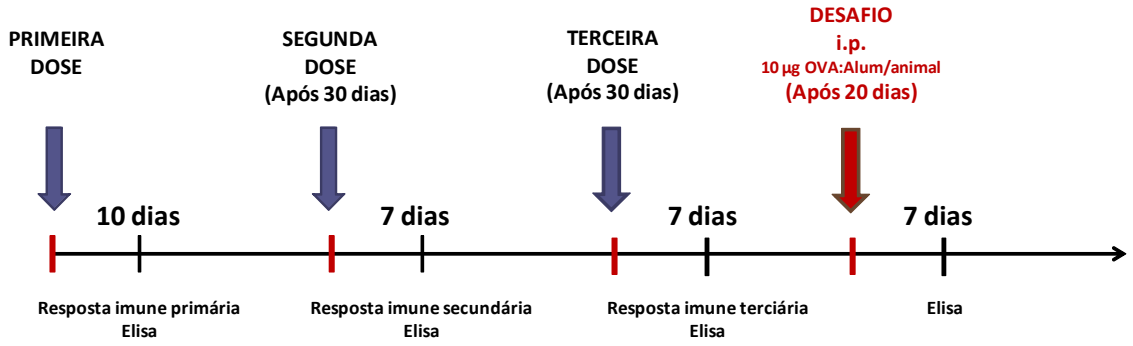


Animais imunizados pelo coxim plantar (s.c.) com 10 µg de OVA ou 10 µg de OVA: 250 µg SBA-15 em duas doses com intervalo de 30 dias. Dez dias após as inoculações, os animais foram sangrados pela base da cauda para a obtenção de soro. A presença de anticorpos IgG anti-OVA foi avaliada por ELISA. **(A)** Produção de anticorpos na resposta primária e **(B)** secundária em densidade ótica (D.O.) e **(C)** em títulos de anticorpos. Leitura a 450 nm; D.O. e títulos de anticorpos expressos em média ± SD e estatisticamente analisados pelo teste paramétrico *t* de Student: $^{*}p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$ OVA *versus* OVA:SBA-15; $^{\#}p < 0,05$ OVA *versus* não imunizados; $^{\S}p < 0,05$, $^{\S\S}p < 0,01$ OVA:SBA-15 *versus* não imunizados. n= 4 animais por grupo.

4.2.2 Efeito da SBA-15 na produção de anticorpos séricos IgG e IgA secretada anti-OVA em imunizações orais

Devido a suas propriedades físico-químicas, acredita-se que a SBA-15 seja um candidato a adjuvante de mucosas. Para verificar esse potencial, camundongos C57BL/6 receberam por gavagem 100µg de OVA, 100µg OVA: 2500µg SBA-15, ou PBS. O soro e extrato de fezes de camundongos imunizados com 10000µg OVA: 10µg toxina colérica (CT) foram utilizados como controle positivo. Os animais receberam três doses do antígeno pela via oral, com intervalos de 30 dias entre as imunizações e, 20 dias após a última dose, foram desafiados com 10 µg de OVA em $Al(OH)_3$, pela via intraperitoneal, para verificar a ativação do sistema pelas imunizações anteriores **(Figura 11)**.

Figura 11- Esquema das imunizações com SBA-15 pela via oral.

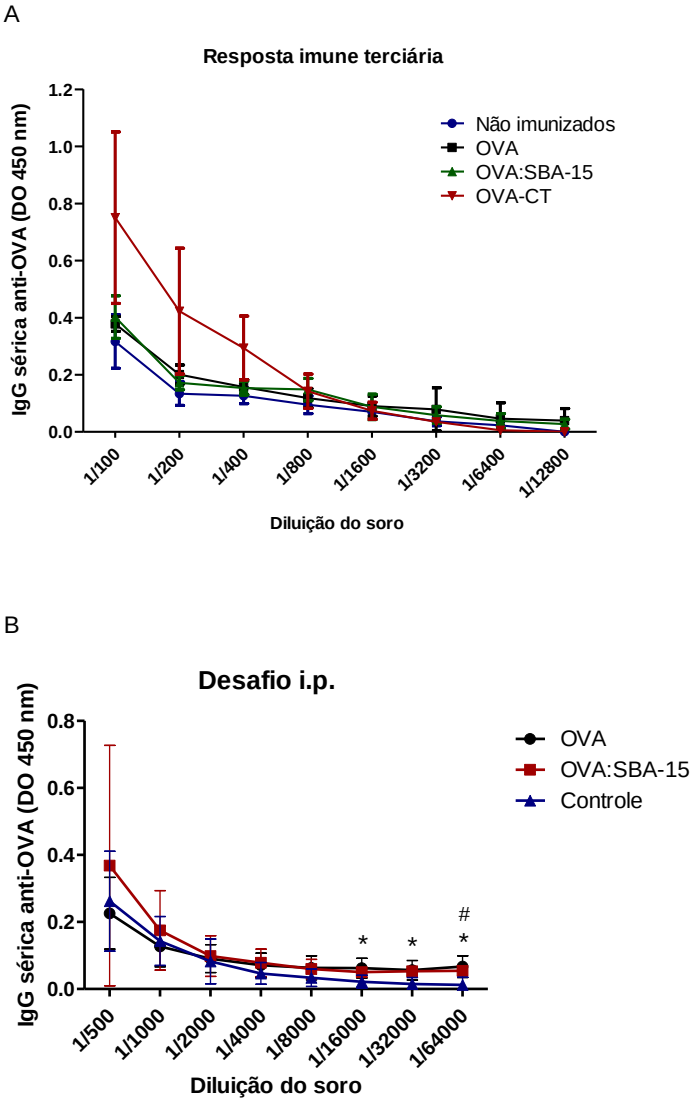


Camundongos C57BL/6 foram imunizados três vezes consecutivas por gavagem com 100 µg de OVA ou 100 µg de OVA: 2500 µg SBA-15, com intervalos de 30 dias entre as imunizações. Passados 20 dias da última dose, os grupos experimentais foram imunizados pela via intraperitoneal com 10 µg de OVA em $Al(OH)_3$. Dez a sete dias após as inoculações, os animais foram sangrados pela base da cauda para a obtenção de soro e tiveram suas fezes colhidas para dosagem de IgA secretada. A presença de anticorpos IgG e IgA anti-OVA foi avaliada por ELISA.

As imunizações pela via oral não induziram a produção local de anticorpos específicos da classe IgA, sendo indetectáveis nas fezes dos animais imunizados. Da mesma forma, não se verificou a presença de anticorpos da classe IgG no soro desses animais nas respostas primária e secundária (dados não mostrados). Após receberem três doses reforço, os níveis de anticorpos IgG específico foram iguais nos grupos OVA, OVA:SBA-15 e não imunizados, indicando o não desenvolvimento da resposta imune humoral **(Figura 12)**. Somente o soro controle de animais imunizados com OVA :CT apresentaram níveis elevados de IgG circulante **(Figura 12A)**.

Após o desafio intraperitoneal, os grupos de camundongos imunizados anteriormente com OVA ou OVA: SBA-15 e o grupo imunizado uma única vez com OVA em $Al(OH)_3$, apresentaram níveis semelhantes de IgG sérica anti-OVA, com títulos em torno de 1:4000, indicando que os animais não foram sensibilizados pelas imunizações orais com esse antígeno **(Figura 12B)**.

Figura 12- Níveis de IgG sérica anti-OVA produzidos por camundongos C57BL/6 imunizados pela via oral.



Os animais foram imunizados por gavagem com 100 µg de OVA ou 100 µg de OVA: 2500 µg SBA-15 em três doses com intervalos de 30 dias. Para o desafio pela via intraperitoneal, utilizou-se 10 µg de OVA: 2000 µg de $Al(OH)_3$. Os animais do grupo controle correspondem a camundongos imunizados com uma dose de 10 µg de OVA: 2000 µg de $Al(OH)_3$. **(A)** Produção de anticorpos sete dias após terceira dose e **(B)** sete dias após desafio intraperitoneal com $Al(OH)_3$. Dosagem realizada pelo método de ELISA. Leitura a 450 nm, Resultados D.O., expressos em média ± SD e estatisticamente analisados pelo teste paramétrico *t* de Student: $^{*}p < 0{,}05$ OVA *versus* OVA: SBA-15; $^{\#}p < 0{,}05$ OVA *versus* não imunizados. n= 4 animais por grupo.

4.3 Análise do potencial de encapsulação de proteínas a sílica nanoestruturada SBA-15

4.3.1 Encapsulação de ovalbumina

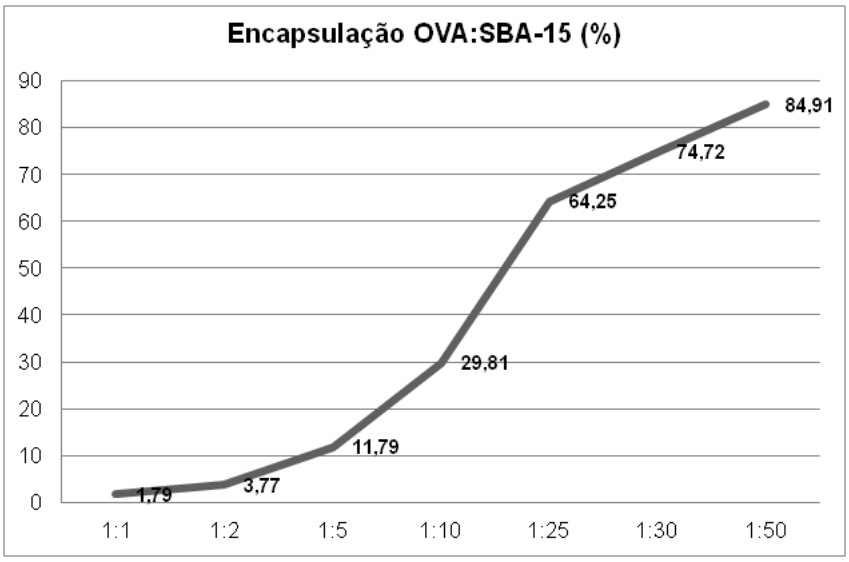
A análise *in vitro* da encapsulação da ovalbumina (uma proteína com 385 aminoácidos e 45 kDa) (NISBET et al., 1980) a SBA-15 confirmou o potencial de ligação dessa partícula **(Quadro 2)**. Observou-se que, quanto maior a proporção de SBA-15, maior a quantidade de proteína encapsulada. Na proporção 1: 50 (1000 µg/mL de OVA: 50000 µg/mL de SBA-15), por exemplo, aproximadamente 85% da OVA ficou retida a sílica **(Figura 13)**. Após essa análise, adotou-se a proporção OVA: SBA-15 de 1: 25 para os ensaios *in vitro* e *in vivo* com esse antígeno.

Quadro 2- Potencial de encapsulação da ovalbumina a sílica nanoestruturada SBA-15.

Proporção OVA:SBA-15	D.O. (562 nm)	Concentração OVA (µg/mL)
OVA (1000 µg/mL)	1,139	883,25
1:1	1,12	867,4166667
1:2	1,099	849,9166667
1:5	1,014	779,0833333
1:10	0,823	619,9166667
1:25	0,458	315,75
1:30	0,347	223,25
1:50	0,239	133,25
SBA-15 (25000 µg/mL)	0,012	0

Concentração de ovalbumina livre no sobrenadante. Resultados expressos em densidade ótica (562 nm) e em µg/mL e representativos de três experimentos independentes.

Figura 13- Porcentagem de encapsulação de ovalbumina a SBA-15.

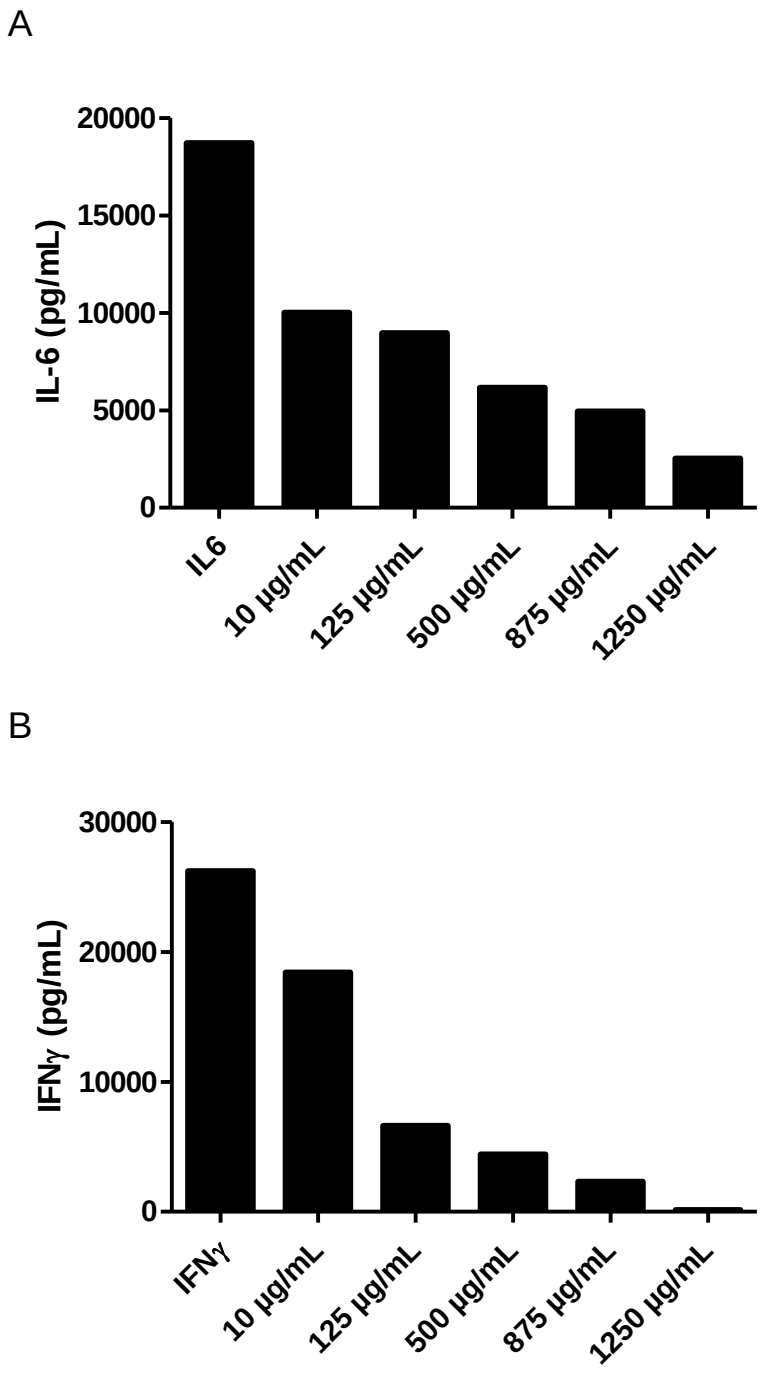


Resultado expresso em porcentagem de proteína encapsulada conforme a razão OVA: SBA-15 e representativo de três experimentos independentes.

4.3.2 Encapsulação de citocinas

Após tentativas frustradas de dosar citocinas, como IL-6 e IFN-γ, do sobrenadante de culturas de DC e linfócitos T que receberam tratamento com SBA-15, percebeu-se que a sílica excedente poderia ligar-se a essas proteínas, impossibilitando a quantificação precisa das citocinas produzidas por essas células. Para nos certificarmos disso, incubamos concentrações conhecidas de IL-6 (20 ng/mL) e IFN-γ (100 ng/mL) com diferentes concentrações de SBA-15 (10, 125, 500, 875 e 1250 µg/mL) por 24 horas, a 4 °C. Após o período de incubação, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante recolhido para dosagem por ELISA das citocinas não encapsuladas. Como esperado, comprovou-se que as citocinas presentes nas culturas foram encapsuladas pela SBA-15, sendo essa encapsulação dose dependente **(Figura 14)**. Por esse motivo, utilizou-se a análise intracelular da produção de citocinas por citometria de fluxo para a dosagem de IL-6 e IFN-γ das culturas celulares.

Figura 14- Encapsulação de citocinas a SBA-15.



As proteínas em concentrações conhecidas, **(A)** IL-6 (20 ng/mL) e **(B)** IFN-γ (100 ng/mL), foram incubadas com diferentes quantidades de SBA-15 (10, 125, 500, 875 e 1250 µg/mL) por 24 horas. As proteínas no sobrenadante foram dosadas por ELISA e os resultados foram expressos em concentração (pg/mL) de IL-6 e IFN-γ nos diferentes tratamentos. Resultados representativos de dois experimentos independentes.

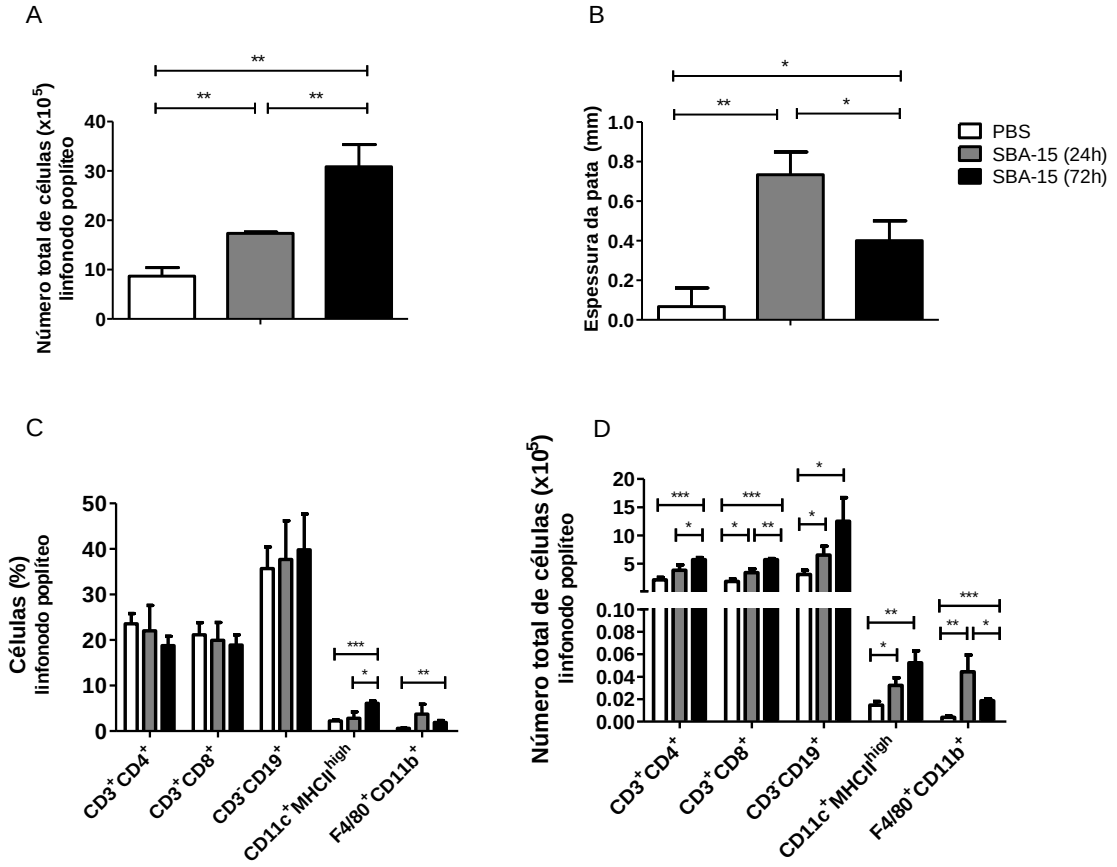
4.4 Recrutamento de células para o linfonodo drenante após a administração subcutânea de SBA-15

Camundongos C57BL/6 receberam, no coxim plantar direito (s.c.), 1000 µg de SBA-15 em 50 µL de PBS para caracterizar os tipos celulares presentes no linfonodo poplíteo, 24 e 72 horas após sua administração. Determinou-se, ainda, o número total de células e o espessamento das patas que receberam as partículas.

Observou-se o crescente aumento no número total de células no linfonodo drenante ($p < 0,01$), comparativamente ao controle com PBS, após 24 e 72 horas da inoculação de sílica **(Figura 15A)**; entretanto, a espessura da pata do grupo de animais que recebeu SBA-15 foi maior nas primeiras 24 horas ($p < 0,01$), e reduzido pela metade após 72 horas da injeção ($p < 0,05$) **(Figura 15B)**.

Não se verificou alterações na porcentagem de linfócitos B $CD19^+$ e T $CD4^+$ e $CD8^+$ durante os períodos analisados **(Figura 15C)**. Porém, comparando o número total dessas células, foi evidente o aumento crescente de linfócitos por até 72 horas pós-inoculação **(Figura 15D)**. Mais importante, comprovou-se o recrutamento de células da imunidade inata, como macrófagos ($CD11b^+F4/80^+$) e DC maduras ($CD11c^+MHCII^{high}$) para o linfonodo drenante. A porcentagem e número total ($p < 0,01$) de macrófagos nos linfonodos de animais que receberam a SBA-15 mostraram-se aumentados principalmente após 24 horas **(Figuras 15C e 15D)**. Quando analisadas as DC, houve aumento constante desses tipos celulares ao longo do período analisado ($p < 0,001$) **(Figuras 15C e 15D)**.

Figura 15– Recrutamento de células para o linfonodo drenante 24 e 72 horas após a administração subcutânea de SBA-15.



Camundongos C57BL/6 foram inoculados no coxim plantar traseiro direito (s.c.) com 1000 µg de SBA-15 em 50 µL de PBS. Como controle, os animais receberam apenas PBS. Após 24 e 72 horas, avaliou-se o **(A)** número total de células (x10^5), **(B)** a espessura da pata inoculada (mm), e os tipos celulares encontrados no linfonodo poplíteo, em **(C)** porcentagem e **(D)** número total (x10^5). Os resultados foram expressos em média ± SD e representativos de dois experimentos independentes. Análise feita pelo teste paramétrico *t* de Student, $^{*}p < 0{,}05$, $^{**}p < 0{,}01$, $^{***}p < 0{,}001$. n= 3 por grupo.

4.5 Efeito da sílica SBA-15 na ativação de BMDC de camundongos C57BL/6

4.5.1 Efeito da SBA-15 na expressão de MHCII e moléculas coestimuladoras CD40, CD80 e CD86 nas BMDC

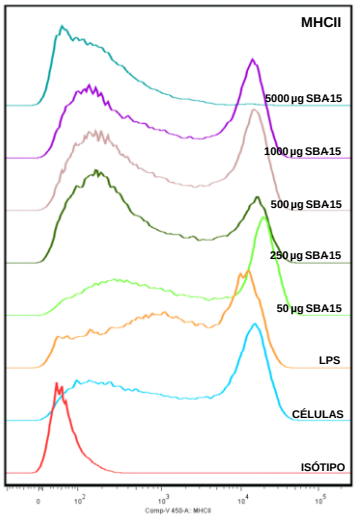
Avaliou-se o papel da SBA-15 na ativação de DC diferenciadas *in vitro*, verificando, por citometria de fluxo, a expressão das moléculas de MHCII, CD40, CD80 e CD86 após incubação, por 6 horas, dessas células com diferentes concentrações de sílica (50, 250, 500, 1000 e 5000 µg/mL). Comparativamente aos controles negativo (meio RPMI) e positivo (100 ng/mL de LPS), não se observou o aumento na expressão dessas moléculas nos tratamentos com SBA-15, indicando que a sílica não influencia na maturação das DC após esse período de incubação **(Figura 16)**.

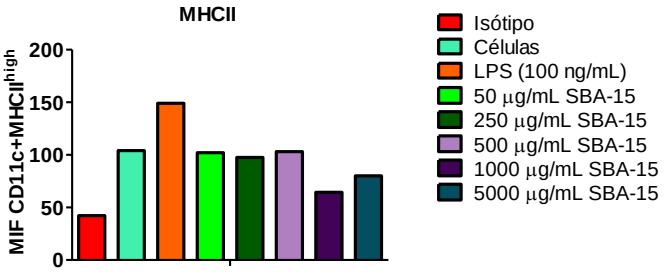
Lâminas obtidas por citocentrifugação indicam que a sílica é fagocitada pelas DC **(Figura 17)**, confirmando o descrito por Vallhov et al. (2012) em BMDC humanas. Nas concentrações de 50 µg/mL e 250 µg/mL, nota-se a presença de partículas de sílica no interior das células **(Figuras 17C e 17D)**; contudo, nas concentrações acima de 500 µg/mL, aparentemente, há saturação do meio devido ao excesso de partículas **(Figuras 17E e 17F)**. Porém, através do uso do marcador de morte celular 7-AAD nos ensaios de citometria de fluxo, verificou-se que, mesmo em altas concentrações de SBA-15, não há o comprometimento da viabilidade celular **(Figura 18)**.

Para verificar se a sílica auxilia na fagocitose de proteínas solúveis, utilizou-se OVA marcada com FITC, previamente incubada ou não com SBA-15, para quantificar e visualizar a fagocitose pelas DC *in vitro*. Dados obtidos por microscopia confocal **(Figura 19)** e citometria de fluxo **(Figura 20)** evidenciaram aumento da porcentagem total e média de intensidade de fluorescência de células $CD11c^+$ $OVA\text{-}FITC^+$ no grupo com SBA-15. Como controle negativo do experimento, células incubadas a 4 °C foram avaliadas **(Figura suplementar 7)**.

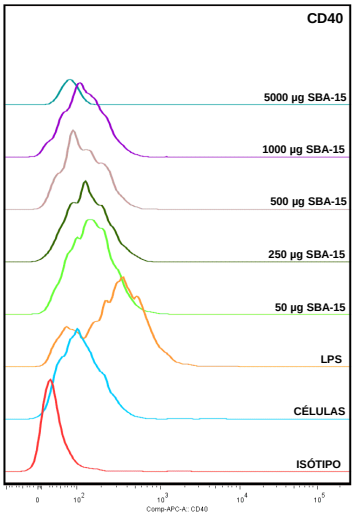
Figura 16- Expressão das moléculas de MHCII, CD40, CD80 e CD86 em BMDC de camundongos C57BL/6 estimuladas por 6 horas com SBA-15.

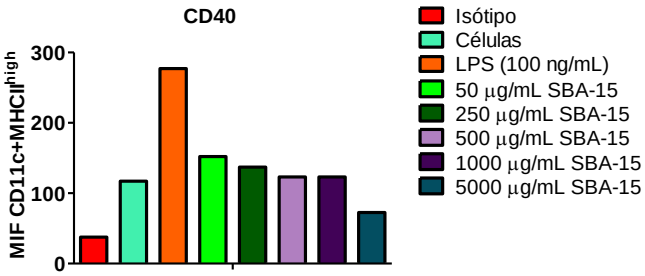
A



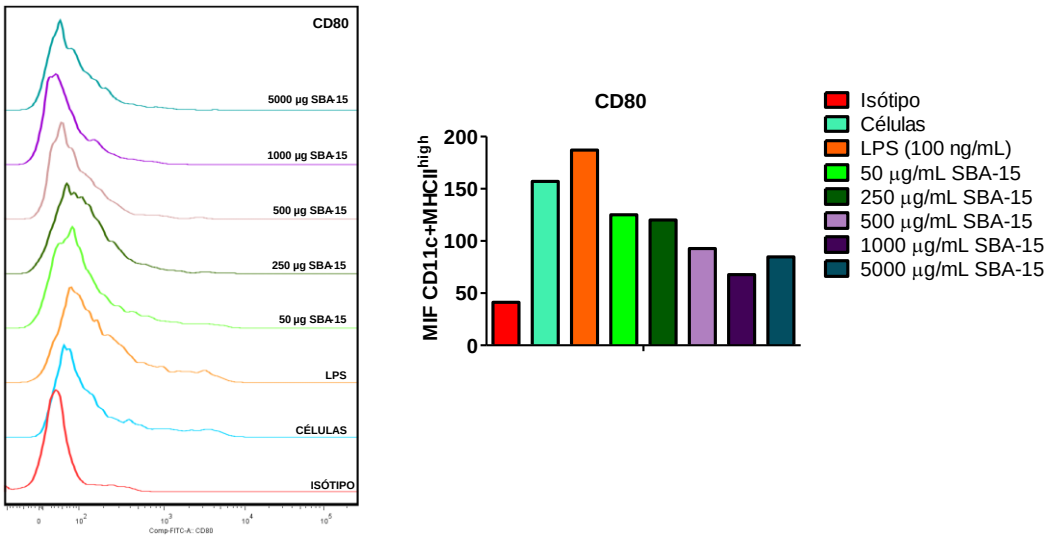


B

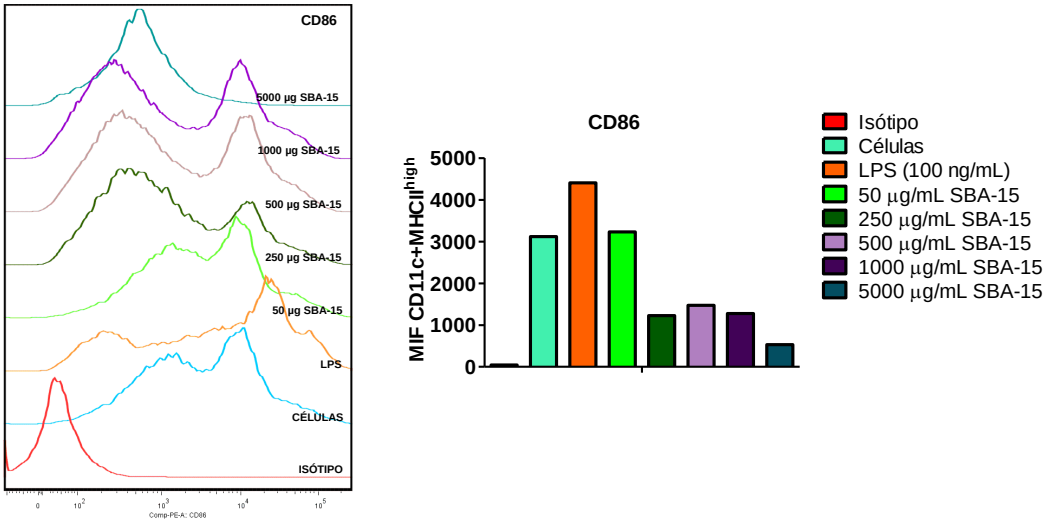




C

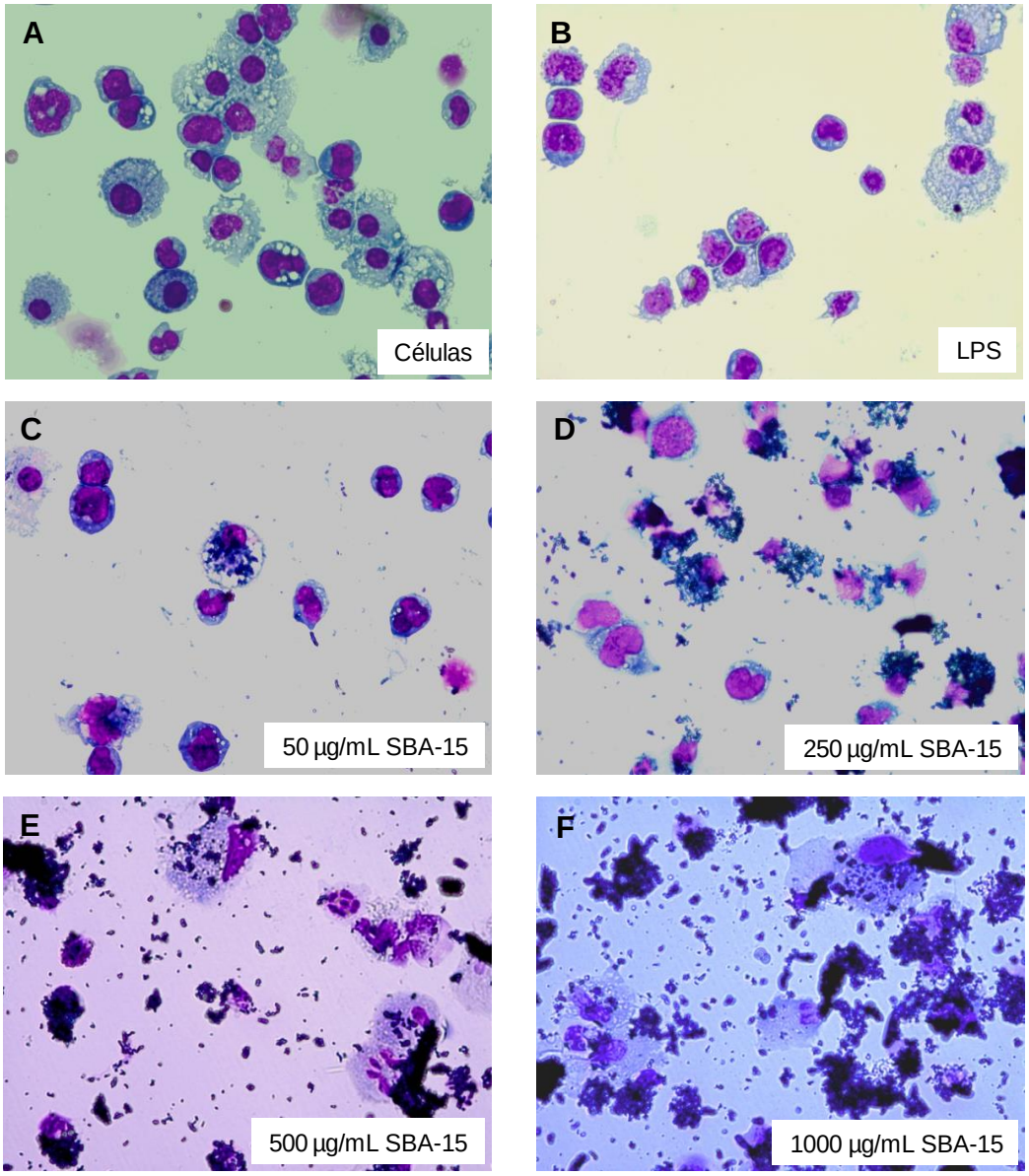


D



BMDC estimuladas com diferentes concentrações de SBA-15 (50-5000 µg/mL) ou LPS (100 ng/mL de LPS) e meio RPMI como controle. Expressão das moléculas analisadas nas células $CD11c^{+}MHCII^{high}$; **(A)** MHCII, **(B)** CD40, **(C)** CD80, **(D)** CD86. Resultados expressos em histogramas e gráficos de barras com a média de intensidade de fluorescência (MIF) das diferentes moléculas e representativos de cinco experimentos independentes.

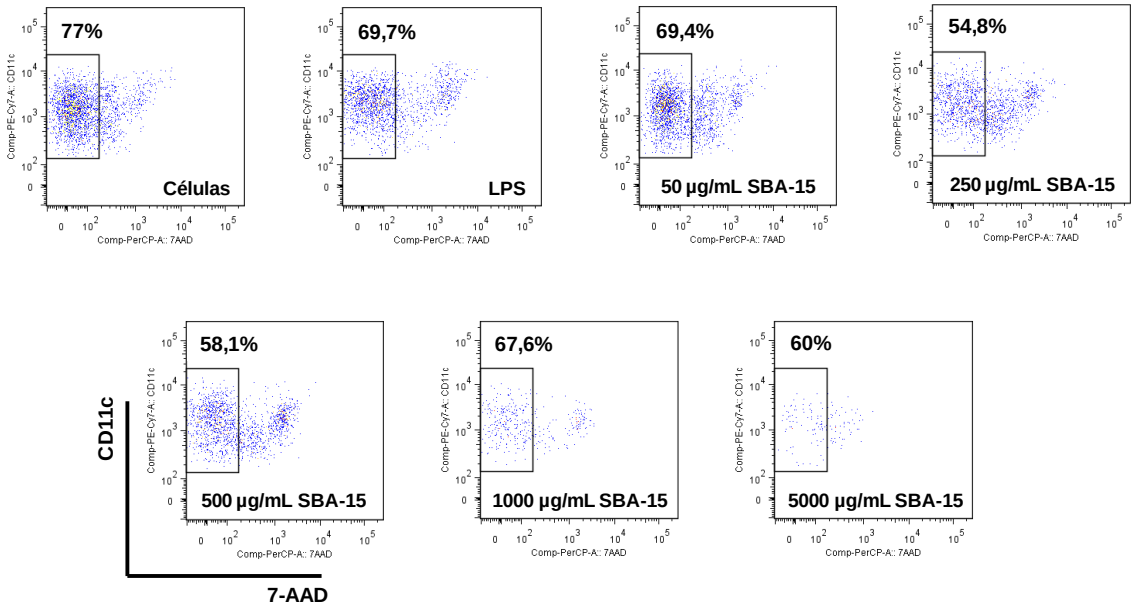
Figura 17- BMDC de camundongos C57BL/6 após tratamento com SBA-15.



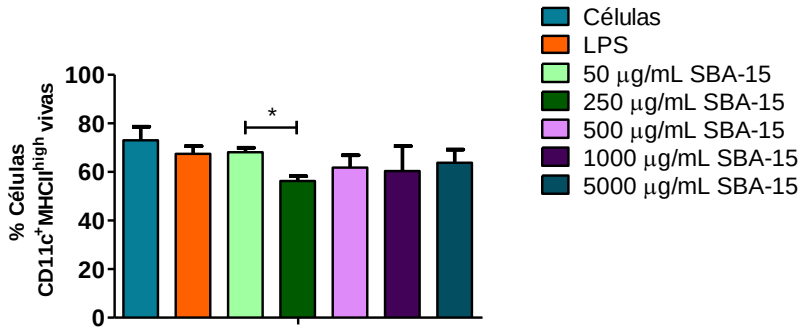
BMDC estimuladas por 6 horas com **(A)** meio RPMI, **(B)** 100 ng/mL de LPS, **(C)** 50 µg/mL, **(D)** 250 µg/mL, **(E)** 500 µg/mL e **(F)** 1000 µg/mL de SBA-15. Lâminas obtidas por citocentrifugação (5 x 10^4 células em 200 µL de PBS) e coradas com HE. Aumento de 40x.

Figura 18- Viabilidade das BMDC de camundongos C57BL/6 em cultura com SBA-15.

A

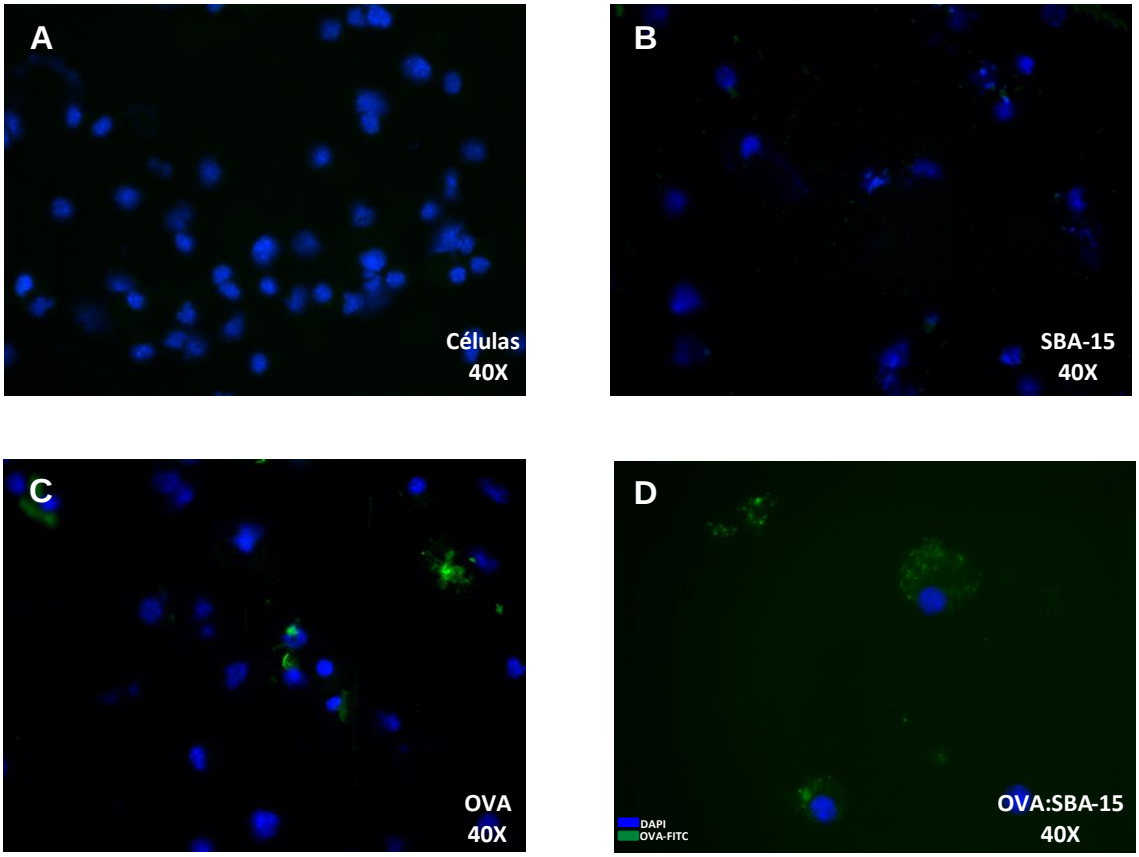


B



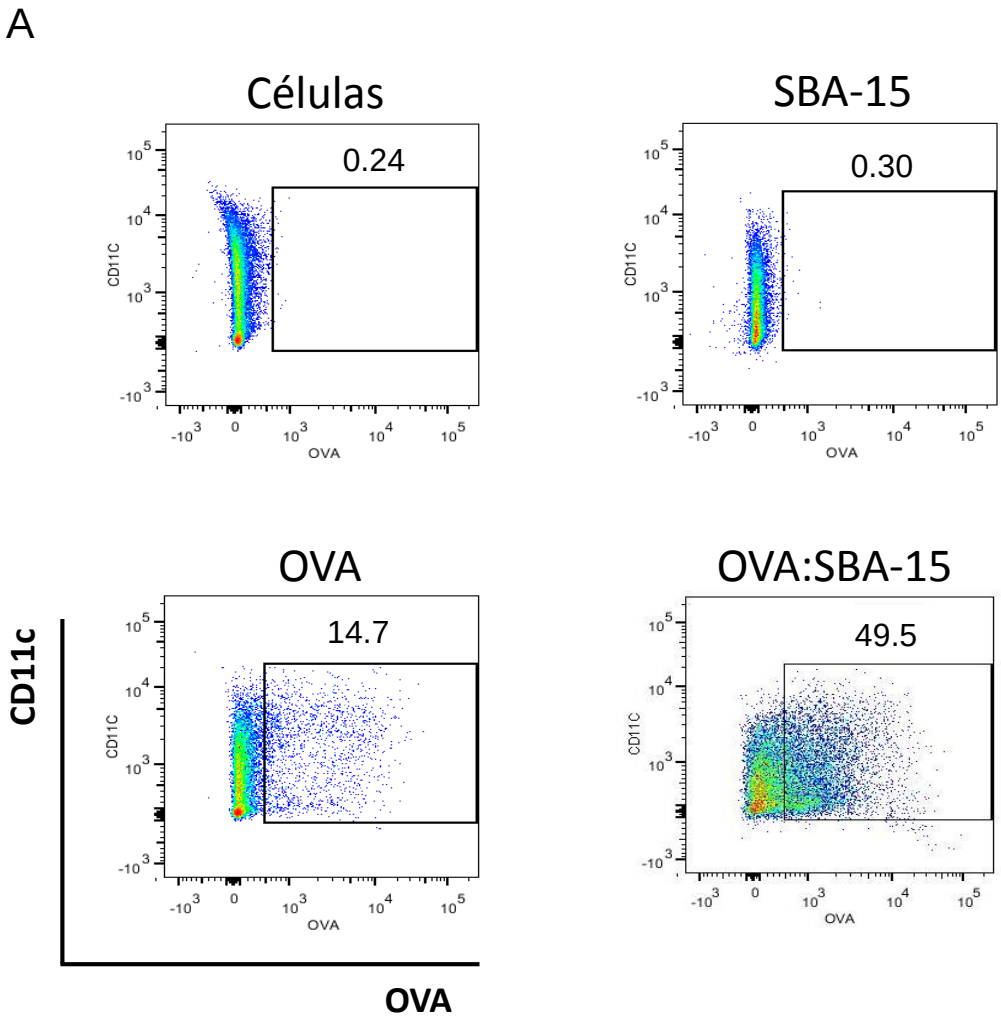
BMDC estimuladas, por 6 horas, com diferentes concentrações de SBA-15 (50-5000 µg/mL) ou LPS (100 ng/mL de LPS) e meio RPMI como controle. Expressão do marcador de morte celular 7-AAD (PerCP) em células $CD11c^{+}MHCII^{high}$. Resultados expressos em **(A)** *dotplots* e **(B)** gráficos de barras com a porcentagem média ± SD de células vivas e representativo de cinco experimentos independentes. Teste *t* de Student $^{*}p < 0,05$, 50 µg/mL *versus* 250 µg/mL.

Figura 19- Efeito da sílica SBA-15 na fagocitose de ovalbumina marcada com fluoresceína (FITC) por BMDC, analisado por microscopia confocal.

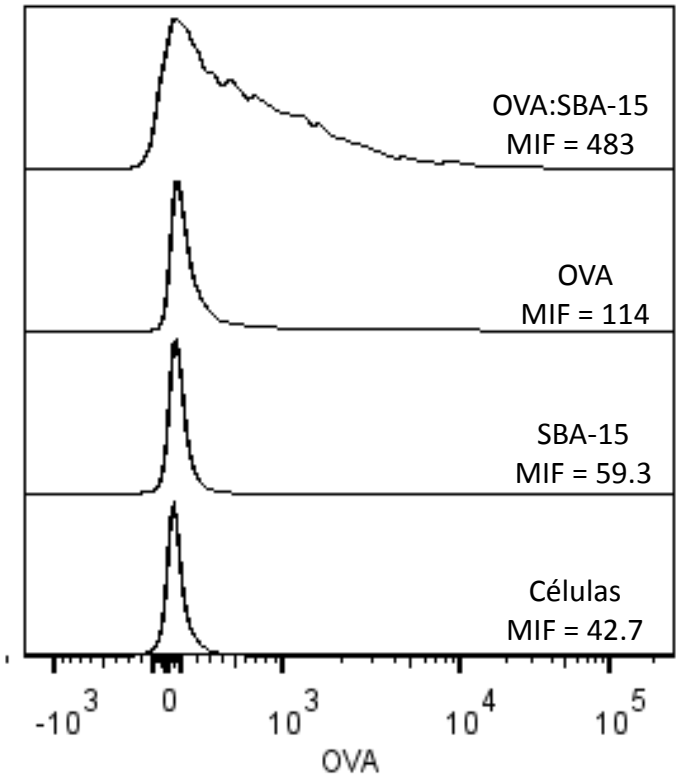


BMDC (5 x 10^5 células) foram cultivadas com **(A)** meio RPMI, **(B)** 125 µg/mL de SBA-15, **(C)** 5 µg/mL de OVA marcada com FITC ou **(C)** 5 µg/mL de OVA: 125 µg/mL de SBA-15 em 1 mL de meio RPMI completo, por 2 horas a 37° C, 5% CO_2. Lâminas obtidas por citocentrifugação (5 x 10^4 células em 200 µL de PBS), coradas com DAPI para visualização dos núcleos e visualizadas em microscópio confocal Apotome Imager.ZI. Aumento de 40x.

Figura 20- Efeito da sílica SBA-15 na fagocitose de ovalbumina marcada com fluoresceína (FITC) por BMDC, analisado por citometria de fluxo.



B

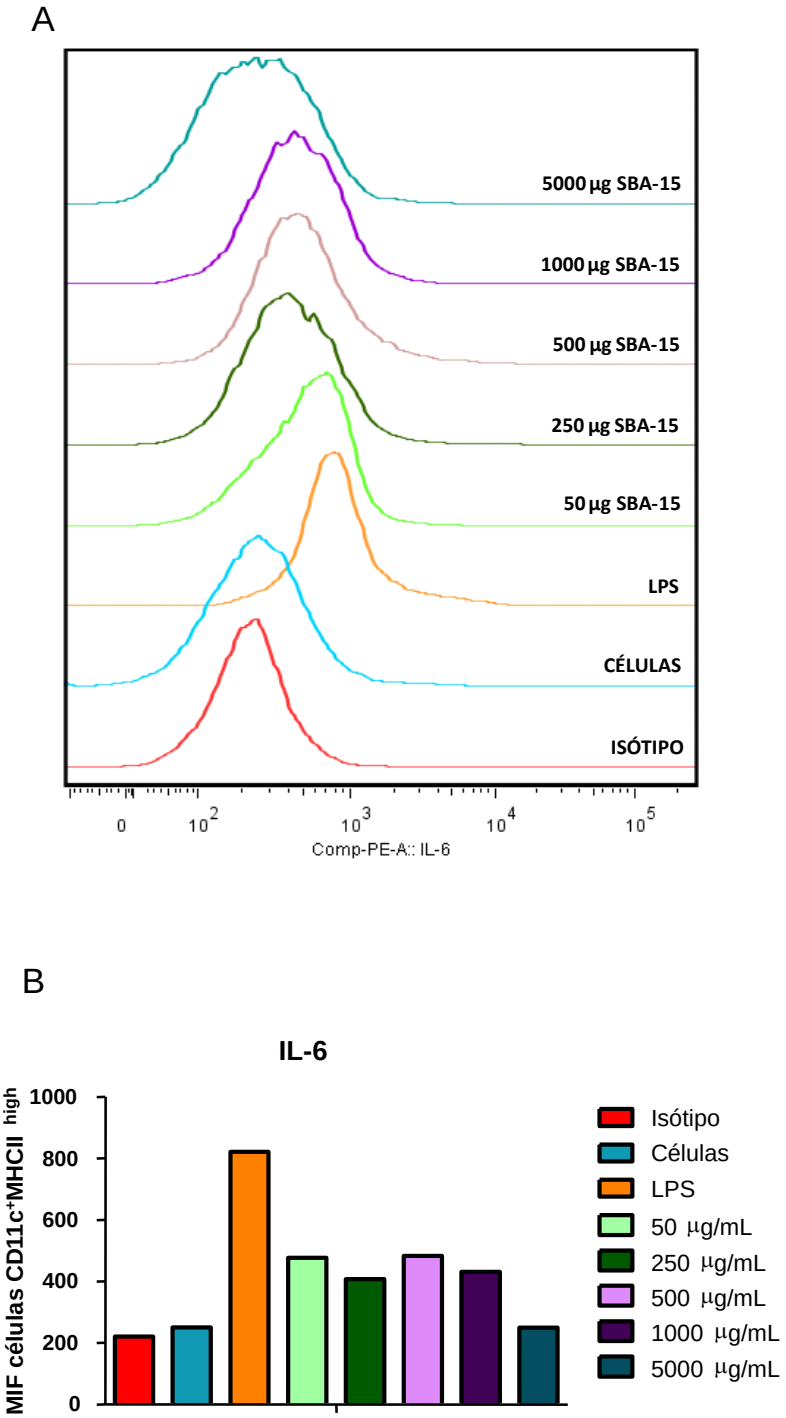


BMDC (5 x 10^5 células) foram cultivadas com 5 µg/mL de OVA marcada com FITC ou com 5 µg/mL de OVA: 125 µg/mL de SBA-15 em 1 mL de meio RPMI completo, por 2 horas a 37 °C, 5% CO_2. Como controle, utilizaram-se BMDC sem tratamento e BMDC incubadas com 125 µg/mL de SBA-15. Células marcadas com anti-CD11c (APC), anti-MHCII (V450) e 7-AAD (PerCP) e adquiridas no citômetro de fluxo CyAN. População de células vivas e $CD11c^{+}MHCII^{high}$ foram selecionadas para as análises. Resultados expressos em **(A)** *dotplots* e **(B)** histogramas com média de intensidade de fluorescência (MIF) de cada grupo. Dados representativos de cinco experimentos independentes.

4.5.2 Efeito da SBA-15 na produção de IL-6 por BMDC

A quantidade de IL-6 produzida pelas BMDC após incubação de 6 horas com a sílica também foi analisada, indicando aumento na produção dessa citocina pró-inflamatória na presença de diferentes concentrações de SBA-15, comparativamente ao controle negativo (meio RPMI) e positivo (LPS). Contudo, a dosagem de 5000 µg/mL de SBA-15 não evidenciou aumento na produção de IL-6 **(Figura 21)**.

Figura 21- Produção de IL-6 por BMDC estimuladas com diferentes concentrações de SBA-15.



Marcação de IL-6 intracelular em BMDC $CD11c^{+}MHCII^{high}$ de camundongos C57BL/6. BMDC estimuladas com diferentes concentrações de SBA-15 (50-5000 µg/mL) ou LPS (100 ng/mL de LPS) e meio RPMI como controle. **(A)** Histograma e **(B)** gráfico de barras com a média de intensidade de fluorescência (MIF) e representativos de três experimentos independentes.

4.6 SBA-15 na apresentação antigênica *in vitro*

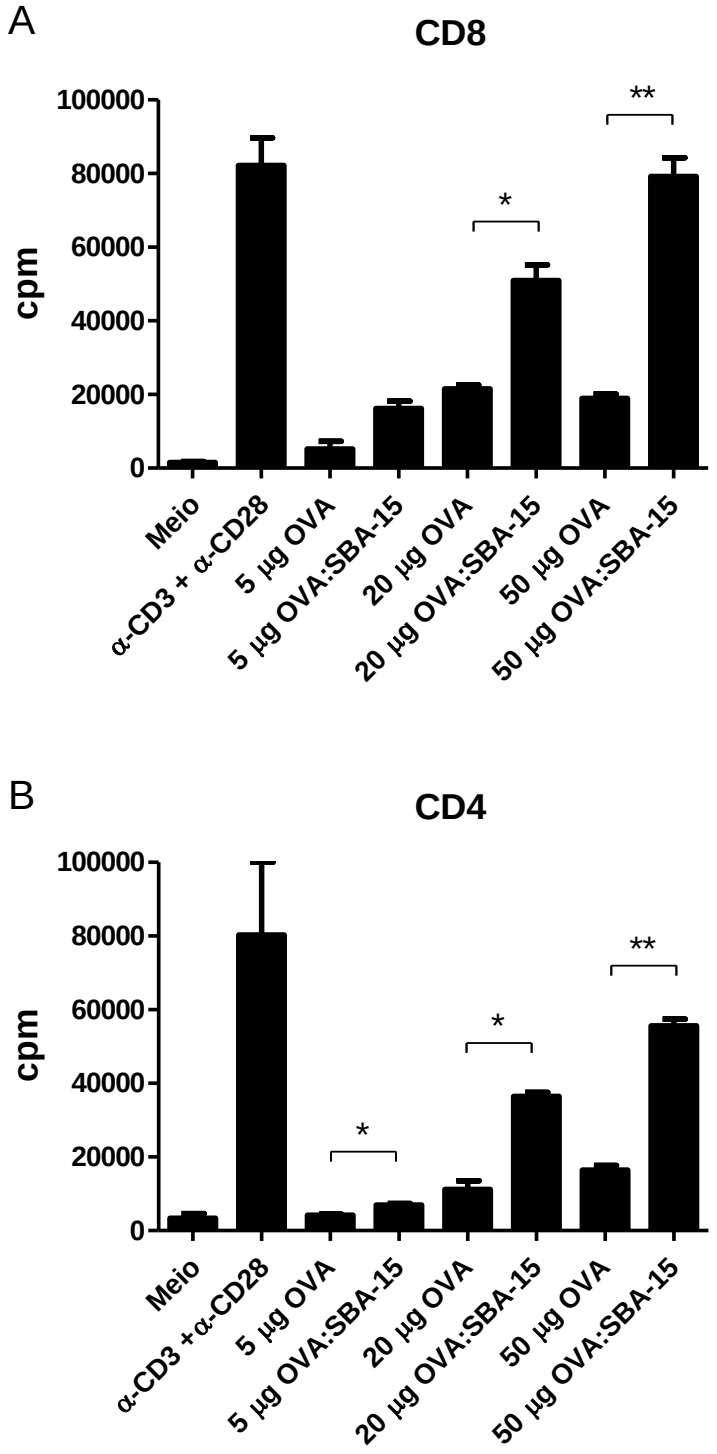
O efeito da sílica SBA-15 na apresentação antigênica *in vitro* foi avaliado utilizando o modelo de cocultura, incubando por três dias BMDC de camundongos C57BL/6 com linfócitos provenientes de camundongos das linhagens OT-I ou OT-II. Padronizou-se a melhor dose de OVA e SBA-15 a ser utilizada nesses experimentos **(Figura 22)**, bem como a melhor proporção DC: linfócitos T (dados não mostrados). A **Figura 22** indica a maior proliferação de linfócitos $CD8^+$ e $CD4^+$, com DC: linfócitos T na proporção 1: 5, quando utilizada a sílica como adjuvante em diferentes concentrações.

Após padronizar a dose em 20 µg/mL de OVA e 500 µg/mL de SBA-15 decidiu-se utilizar as DC como fator limitante da cocultura. Dessa forma, adicionou-se 5 x 10^4 BMDC, previamente tratadas por duas horas com antígenos e controles (Meio RPMI; 20 µg/mL de OVA; 20 µg/mL de OVA: 500 µg/mL SBA-15; 1 µg/mL de peptídeos $OVA_{257-264}$ ou $OVA_{323-339}$; 1 µg/mL de peptídeos $OVA_{257-264}$ ou $OVA_{323-339}$: 25 µg/mL de SBA-15; 500 µg/mL SBA-15), diluídas em série em placas de 96 poços e linfócitos T isolados de camundongos OT-I ou OT-II no total de 10 x 10^4 células por poço. Após o período de incubação de 3 dias, verificou-se a proliferação e ativação desses linfócitos T através da absorção de timidina, diluição de CFSE e produção de IFN-γ.

Analisando a resposta dos linfócitos T $CD8^+$, sugere-se que a SBA-15 seja capaz de induzir a apresentação cruzada de OVA e seus peptídeos pelas DC e, consequentemente, ativar esses tipos celulares. A proliferação de linfócitos T $CD8^+$ foi estatisticamente significante na presença de 781,25 DC ($p < 0,05$) tratadas com OVA:SBA-15 e com 390,62 DC pulsadas com $OVA_{257-264}$:SBA-15 :SBA-15 ($p < 0,05$) **(Figura 23)**. Da mesma forma, embora estatisticamente não significante, houve maior produção de IFN-γ após tratamento com a sílica **(Figura 24)**.

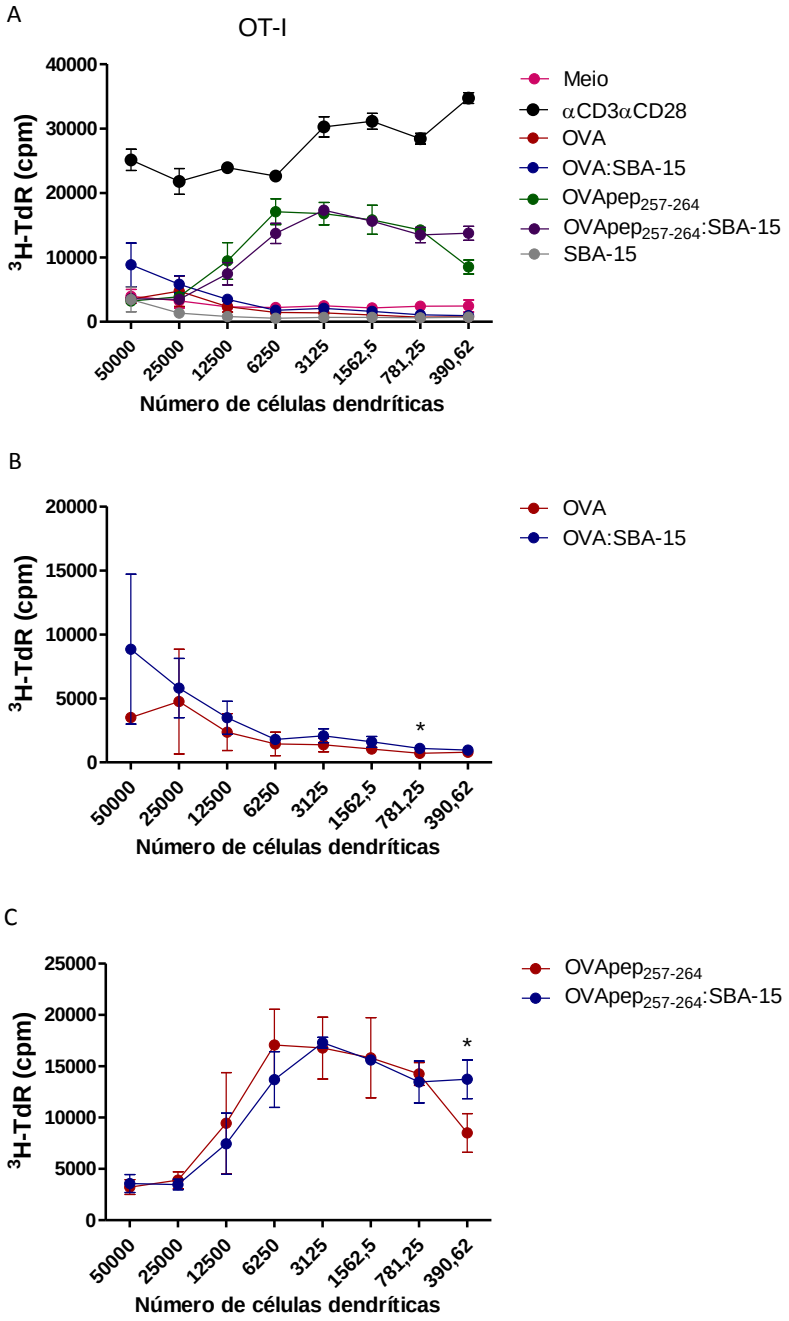
Quando analisada a proliferação de linfócitos T $CD4^+$, verificou-se diferença estatística ($p < 0,05$) na expansão de células após cocultura com 3125 BMDC tratadas com OVA ou OVA: SBA-15 **(Figura 25B)**. A apresentação do peptídeo $OVA_{323-339}$ por 12500 DC ($p < 0,01$) e 3125 DC ($p < 0,05$) mostrou-se mais eficiente após tratamento com SBA-15, fato comprovado pela maior proliferação desses linfócitos **(Figura 25C)**. A produção de IFN-γ por linfócitos T $CD4^+$ em cultura foi aumentada nos grupos OVA: SBA-15 ($p < 0,05$) e $OVA_{323-339}$:SBA-15 ($p < 0,05$), indicando que a sílica tem papel na ativação de linfócitos T auxiliares **(Figura 26)**.

Figura 22- Efeito da SBA-15 na proliferação de linfócitos T *in vitro*.



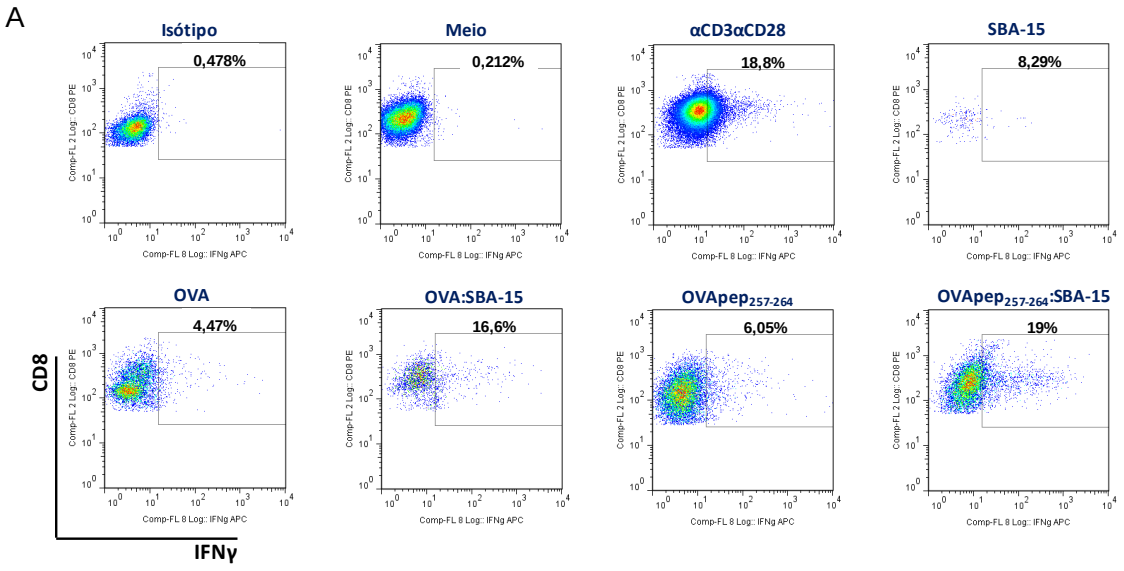
BMDC de camundongos C57BL/6 foram incubadas por 2 horas com diferentes tratamentos (Controles positivo e negativo, OVA, OVA: SBA-15 em diferentes concentrações, mantendo a proporção antígeno:SBA-15 em 1:25) e colocadas em cultura com linfócitos provenientes de camundongos das linhagens **(A)** OT-I ou **(B)** OT-II por três dias. A proliferação dos linfócitos T foi avaliada pela absorção de timidina. Resultados expressos em média ± SD e representativos de três experimentos independentes; o tratamento com OVA sem sílica foi usado como referência para análise do teste paramétrico *t* de Student, $^{*}p < 0{,}05$; $^{**}p < 0{,}01$.

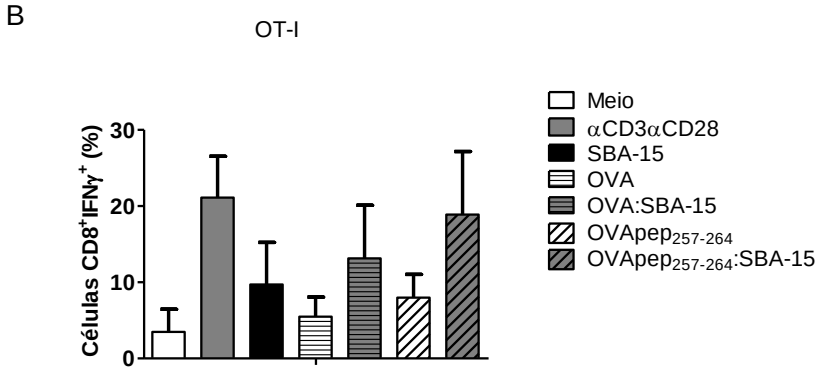
Figura 23- Efeito da SBA-15 na proliferação de linfócitos T CD8$^+$ *in vitro*.



BMDC de camundongos C57BL/6 foram incubadas por 2 horas com diferentes tratamentos (Meio RPMI; 20 µg/mL de OVA; 20 µg/mL de OVA: 500 µg/mL SBA-15; 1 µg/mL de peptídeo OVA$_{257-264}$; 1 µg/mL de peptídeo OVA$_{257-264}$: 25 µg/mL de SBA-15 e 500 µg/mL SBA-15) e colocadas em cultura com linfócitos provenientes de camundongos da linhagem OT-I por três dias. A proliferação dos T CD8$^+$ foi avaliada pela absorção de timidina e expressa em contagem por minuto (cpm). Efeito na proliferação de T CD8$^+$ com **(A)** todos os tratamentos, **(B)** OVA e OVA:SBA-15 e **(C)** peptídeo OVA$_{257-264}$ e OVA$_{257-264}$:SBA-15. Foram usados como controle, células em meio RPMI completo, 500 µg/mL de SBA-15 ou anti-CD3 e anti-CD28 em meio RPMI completo. Resultados expressos em média ± SD e representativos de três experimentos independentes; tratamentos com OVA ou peptídeo sem sílica foram usados como referência para análise do teste paramétrico *t* de Student, $^*p < 0,05$.

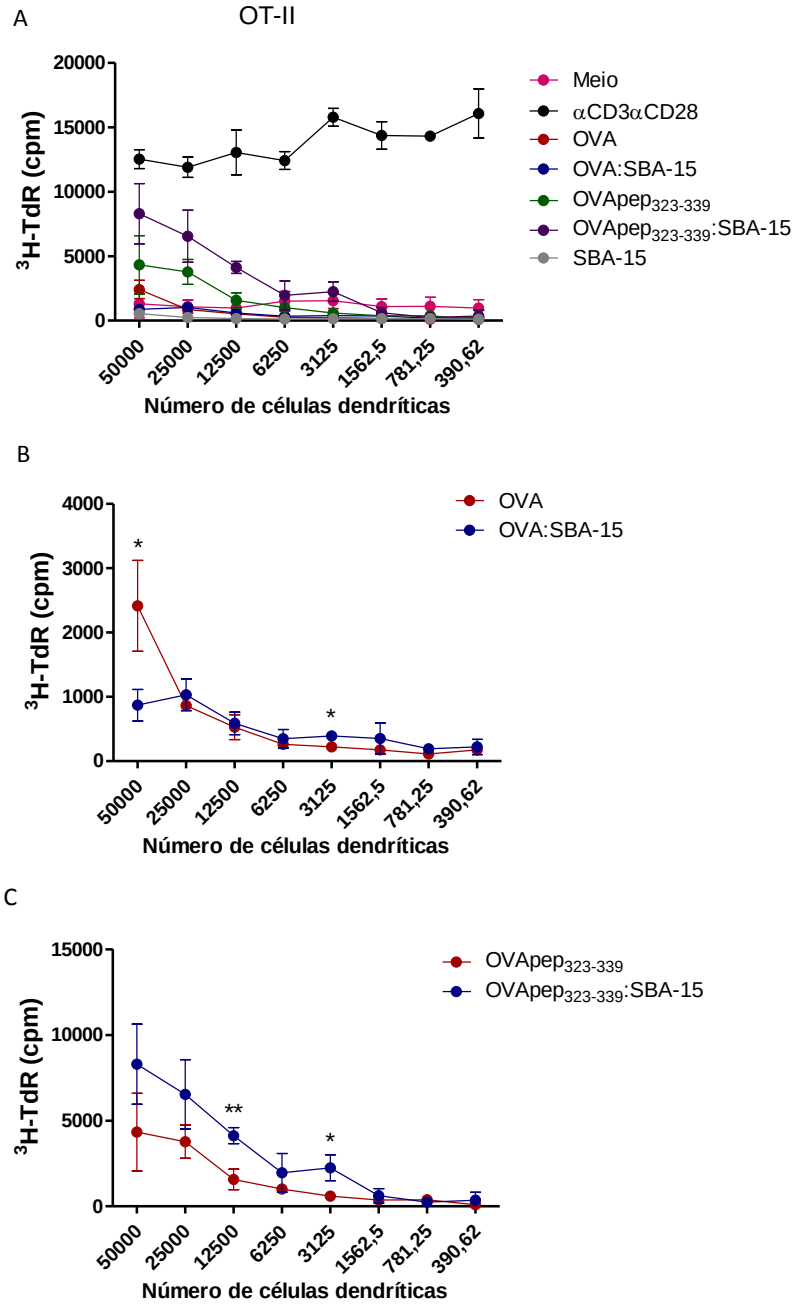
Figura 24- Produção de IFN-γ por linfócitos T CD8$^+$ em cocultura.





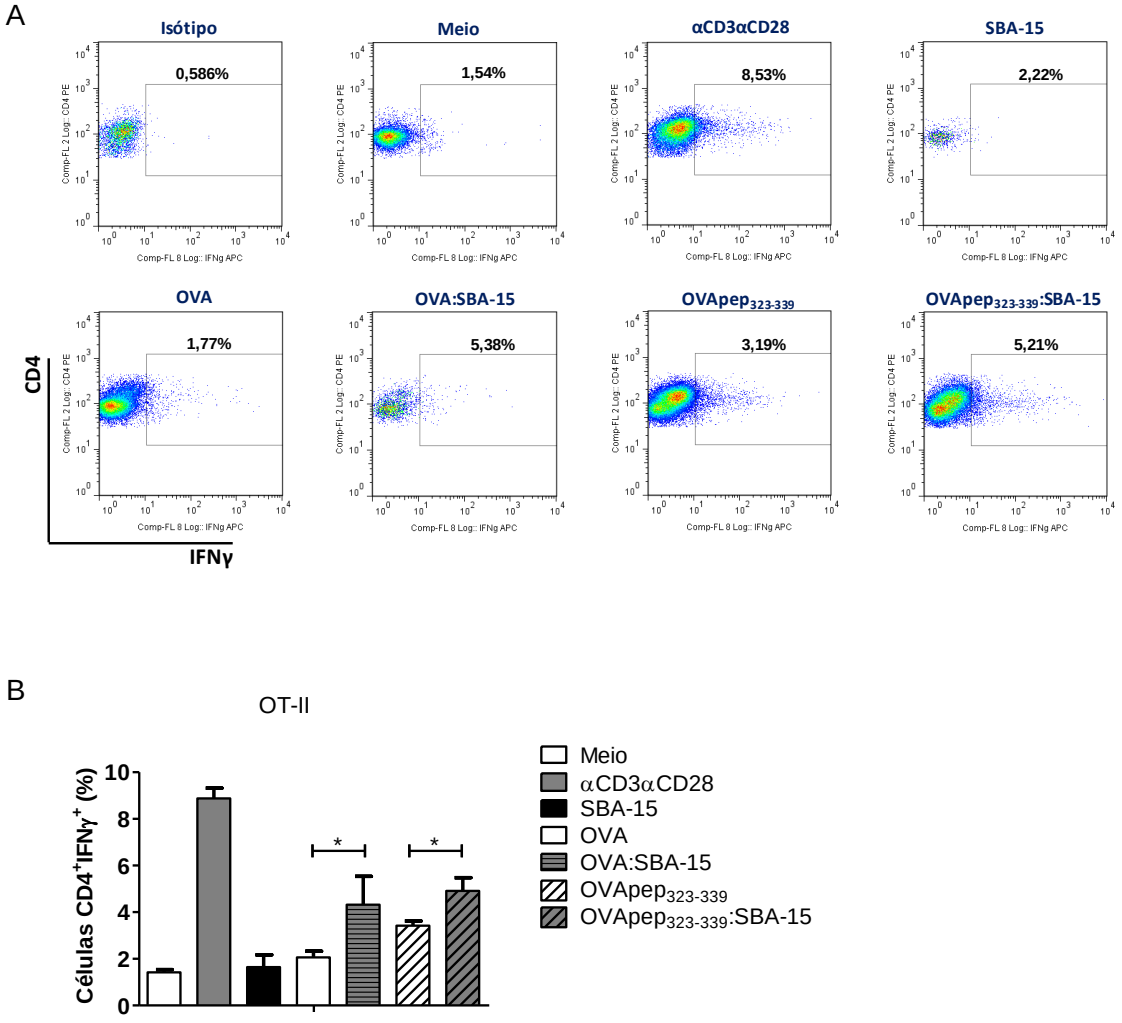
BMDC de camundongos C57BL/6 foram incubadas por 2 horas com diferentes tratamentos (Meio RPMI; 20 µg/mL de OVA; 20 µg/mL de OVA: 500 µg/mL SBA-15; 1 µg/mL de peptídeo $OVA_{257-264}$; 1 µg/mL de peptídeo $OVA_{257-264}$: 25 µg/mL de SBA-15 e 500 µg/mL SBA-15) e colocadas em cultura com linfócitos provenientes de camundongos da linhagem OT-I por três dias. A produção de IFN-γ por T CD8$^+$ foi avaliada por marcação intracelular e expressa em porcentagem de células CD8$^+$ IFN-γ$^+$ em **(A)** *dotplot* e **(B)** gráfico de barras. Foram usados como controle, células em meio RPMI completo, 500 µg/mL de SBA-15 ou anti-CD3 e anti-CD28 em meio RPMI completo. Resultados expressos em média ± SD e representativos de três experimentos independentes; tratamentos com OVA ou peptídeo sem sílica foram usados como referência para análise do teste paramétrico *t* de Student.

Figura 25- Efeito da SBA-15 na proliferação de linfócitos T CD4$^+$ *in vitro*.



BMDC de camundongos C57BL/6 foram incubadas por 2 horas com diferentes tratamentos (Meio RPMI; 20 µg/mL de OVA; 20 µg/mL de OVA: 500 µg/mL SBA-15; 1 µg/mL de peptídeo OVA$_{323-339}$; 1 µg/mL de peptídeo OVA$_{323-339}$: 25 µg/mL de SBA-15 e 500 µg/mL SBA-15) e colocadas em cultura com linfócitos provenientes de camundongos da linhagem OT-II por três dias. A proliferação dos T CD4$^+$ foi avaliada pela absorção de timidina e expressa em contagem por minuto (cpm). Efeito na proliferação de T CD4$^+$ com **(A)** todos os tratamentos, **(B)** OVA e OVA:SBA-15 e **(C)** peptídeo OVA$_{323-339}$ e OVA$_{323-339}$:SBA-15. Foram usados como controle, células em meio RPMI completo, 500 µg/mL de SBA-15 ou anti-CD3 e anti-CD28 em meio RPMI completo. Resultados expressos em média ± SD e representativos de três experimentos independentes; tratamentos com OVA ou peptídeo sem sílica foram usados como referência para análise do teste paramétrico *t* de Student, $^*p < 0{,}05$, $^{**}p < 0{,}01$.

Figura 26- Produção de IFN-γ por linfócitos T CD4$^+$ em cocultura.



BMDC de camundongos C57BL/6 foram incubadas por 2 horas com diferentes tratamentos (Meio RPMI; 20 µg/mL de OVA; 20 µg/mL de OVA: 500 µg/mL SBA-15; 1 µg/mL de peptídeo $OVA_{323-339}$; 1 µg/mL de peptídeo $OVA_{323-339}$: 25 µg/mL de SBA-15 e 500 µg/mL SBA-15) e colocadas em cultura com linfócitos provenientes de camundongos da linhagem OT-II por três dias. A produção de IFN-γ por T CD4$^+$ foi avaliada por marcação intracelular e expressa em porcentagem de células CD4$^+$ IFN-γ$^+$ em **(A)** *dotplot* e gráfico de barras **(B)**. Foram usados como controle, células em meio RPMI completo, 500 µg/mL de SBA-15 ou anti-CD3 e anti-CD28 em meio RPMI completo. Resultados expressos em média ± SD e representativos de três experimentos independentes; tratamentos com OVA ou peptídeo sem sílica foram usados como referência para análise do teste paramétrico *t* de Student, $^*p < 0,05$.

4.7 SBA-15 na apresentação antigênica *in vivo*

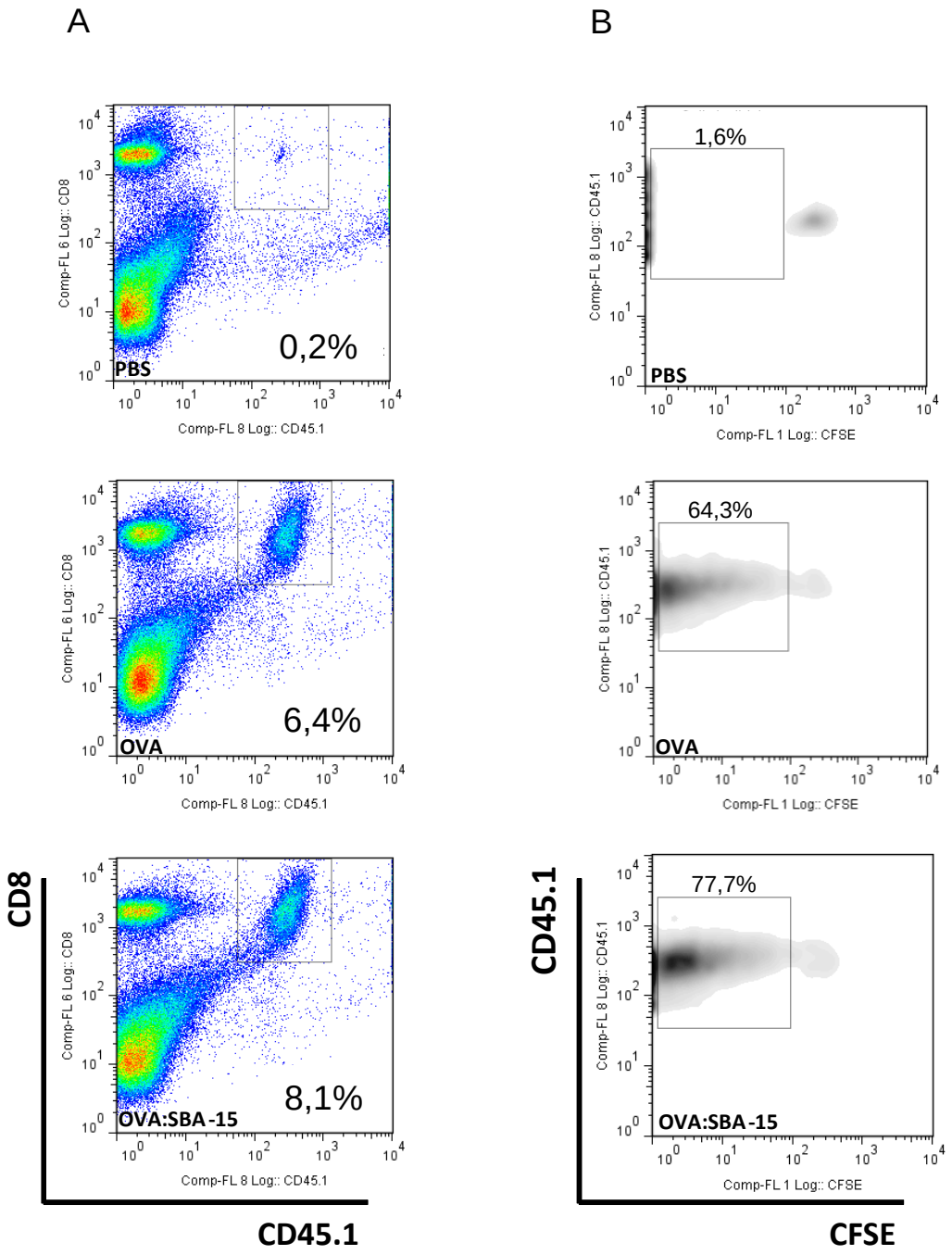
Para verificar o papel da sílica na apresentação antigênica *in vivo*, utilizou-se o sistema de transferência adotiva de linfócitos responsivos à OVA. Linfonodos periféricos de camundongos OT-I ou OT-II (CD45.1) foram retirados para obtenção de células posteriormente marcadas com CFSE. Injetou-se, via intravenosa, 5 x 10^6 células marcadas em camundongos recipientes C57BL/6 (CD45.2). Passadas 24 horas, os recipientes foram imunizados com 10 µg de OVA, 10 µg de OVA: 250 µg de SBA-15 ou PBS no coxim plantar em volume final de 50 µL e, após 4 dias, os linfonodos poplíteos foram isolados e suas células avaliadas quanto à porcentagem de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ provenientes dos camundongos doadores, porcentagem de linfócitos em divisão e número total de células por linfonodo **(Figuras 27 a 30)**.

Os experimentos de transferência adotiva revelaram que não houve diferença no número total de células nos linfonodos após imunização com OVA ou OVA:SBA-15, diferindo apenas em relação ao grupo controle **(Figura 28A e 30A)**.

O número de células provenientes dos animais OT-I e OT-II ($CD8^+CD45.1^+$ ou $CD4^+CD45.1^+$), não foi diferente nos grupos imunizados com ou sem SBA-15, diferindo apenas comparativamente ao grupo que recebeu PBS **(Figura 28B e 30B)**.

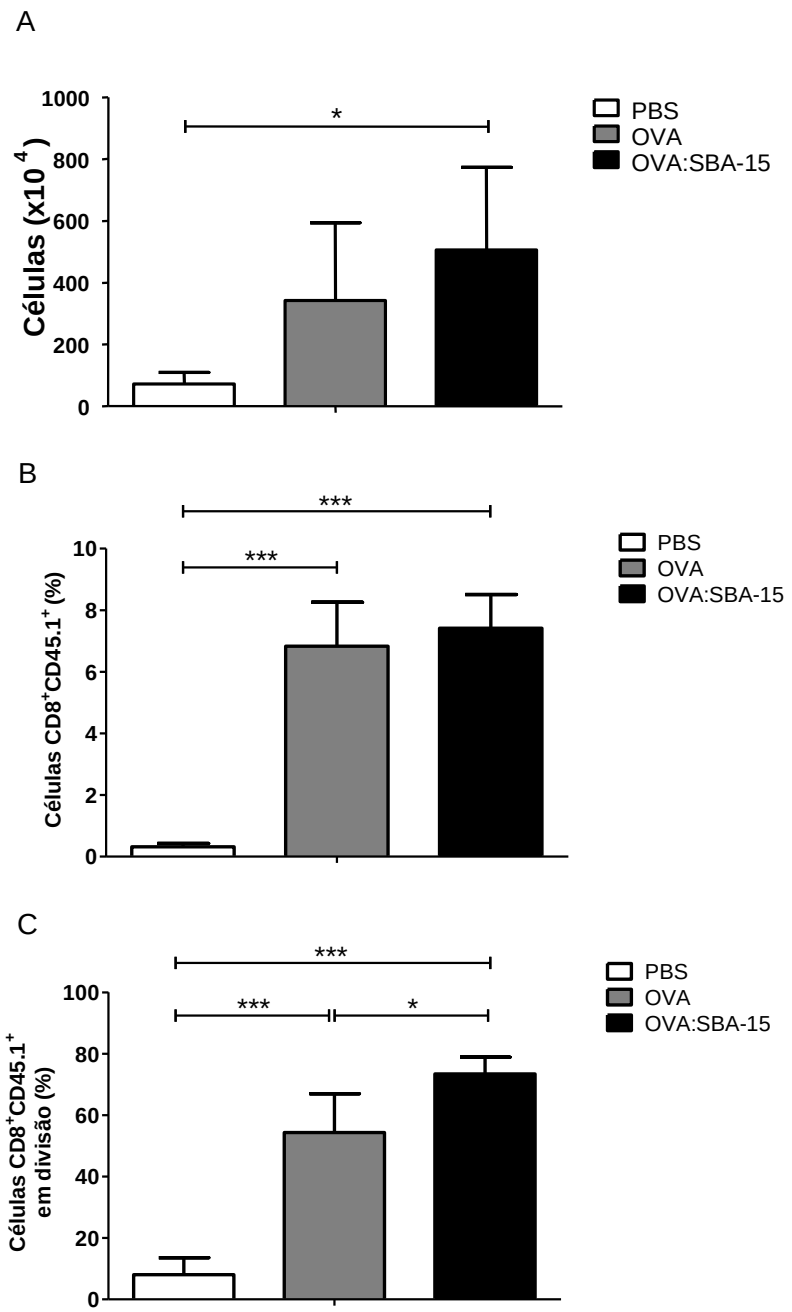
Comparando a porcentagem de células dos doadores em divisão, notou-se maior proliferação de linfócitos no grupo imunizado com a sílica, sendo significativa apenas em linfócitos T $CD8^+$ **(Figuras 28C e 30C)**.

Figura 27- SBA-15 na apresentação antigênica a linfócitos T CD8$^+$ *in vivo*.



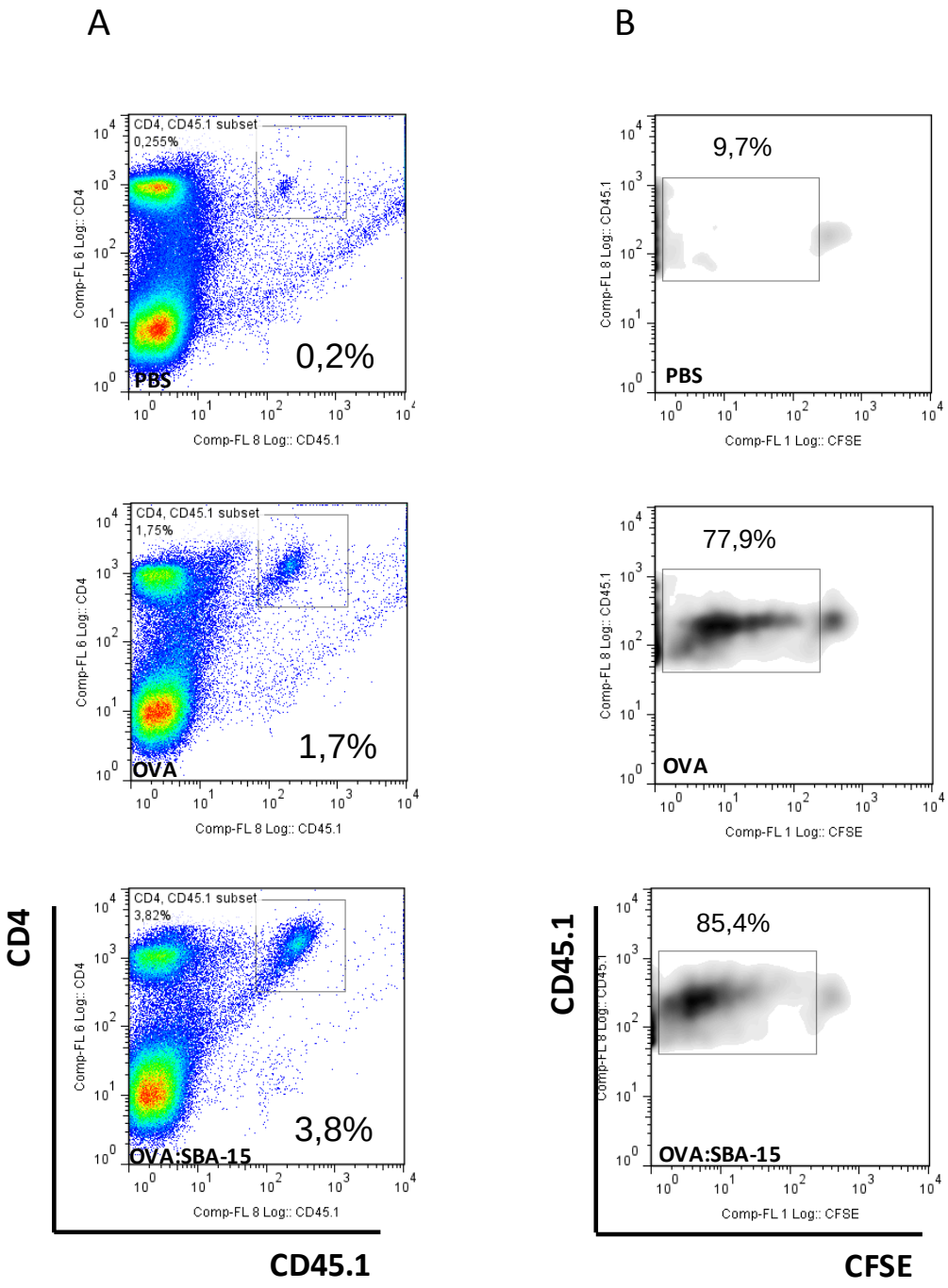
Camundongos C57BL/6 (CD45.2) receberam pela via intravenosa 5 x 10^6 células isoladas e marcadas com CFSE dos linfonodos periféricos de camundongos OT-I (CD45.1.2). Após 24 horas, os animais recipientes foram imunizados com 10 µg de OVA ou 10 µg de OVA: 250 µg de SBA-15 no coxim plantar em volume final de 50 µL. Como controle, camundongos receberam 50 µL de PBS. Passados quatro dias, retirou-se os linfonodos poplíteos dos animais imunizados e avaliou-se a **(A)** porcentagem de células CD8$^+$ provenientes dos camundongos doadores (CD45.1$^+$) e a **(B)** porcentagem de células CD45.1$^+$CD8$^+$CFSE$^+$ em divisão através da diluição de CFSE. Resultados representativos de três experimentos independentes; n= 3 animais por grupo.

Figura 28- SBA-15 na proliferação de linfócitos T CD8$^+$ *in vivo*.



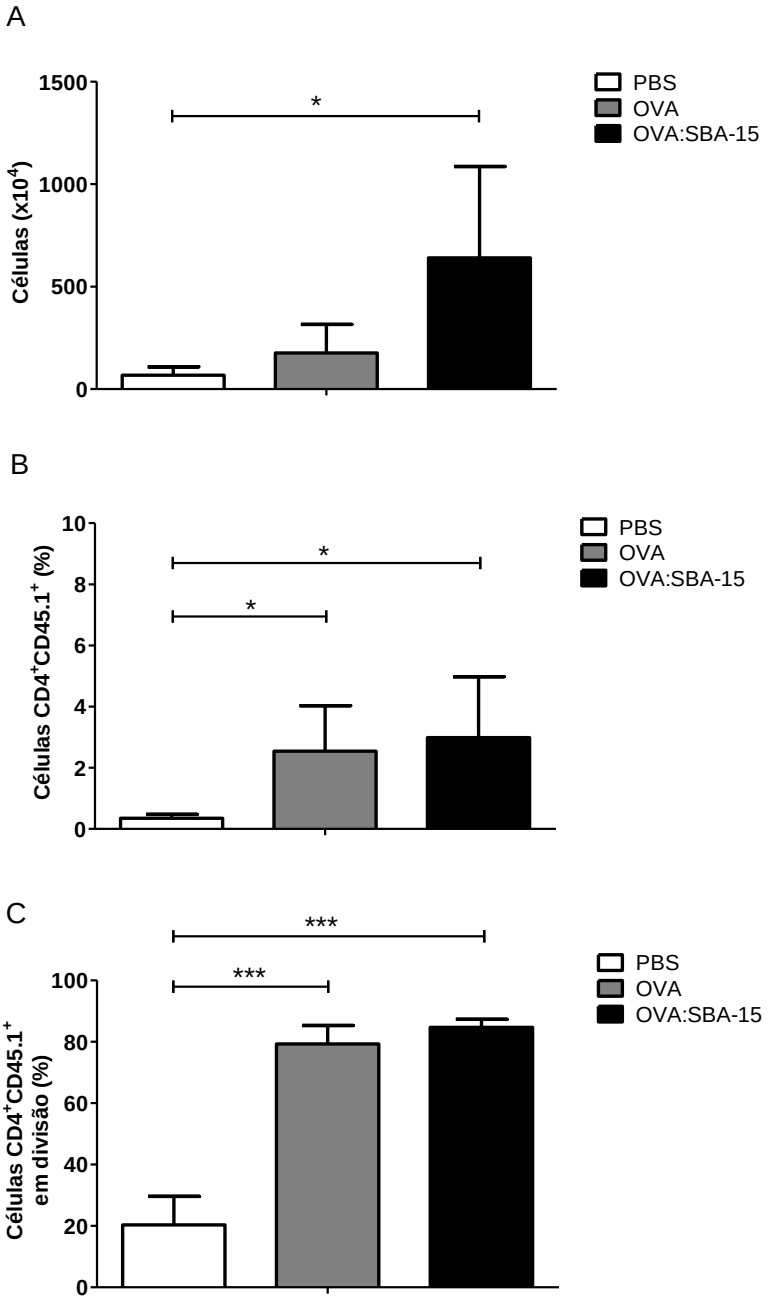
Camundongos C57BL/6 (CD45.2) receberam pela via intravenosa 5 x 10^6 células isoladas e marcadas com CFSE dos linfonodos periféricos de camundongos OT-I (CD45.1.2). Após 24 horas, os animais recipientes foram imunizados com 10 µg de OVA ou 10 µg de OVA: 250 µg de SBA-15 no coxim plantar em volume final de 50 µL. Como controle, camundongos receberam 50 µL de PBS. Passados quatro dias, retiraram-se os linfonodos poplíteos dos animais imunizados e avaliou-se **(A)** o número total de células no linfonodo, **(B)** a porcentagem de células CD8$^+$ provenientes dos camundongos doadores (CD45.1$^+$) e **(C)** a porcentagem de células CD45.1$^+$CD8$^+$CFSE$^+$ em divisão através da diluição de CFSE. Resultados expressos em média ± SD e estatisticamente analisados pelo teste paramétrico *t* de Student $^*p < 0,05$, $^{***}p < 0,001$; e representativos de três experimentos independentes; n= 3 animais por grupo.

Figura 29- SBA-15 na apresentação antigênica a linfócitos T CD4$^+$ *in vivo*.



Camundongos C57BL/6 (CD45.2) receberam pela via intravenosa 5 x 10^6 células isoladas e marcadas com CFSE dos linfonodos periféricos de camundongos OT-II (CD45.1.2). Após 24 horas, os animais recipientes foram imunizados com 10 µg de OVA ou 10 µg de OVA: 250 µg de SBA-15 no coxim plantar em volume final de 50 µL. Como controle, camundongos receberam 50 µL de PBS. Passados quatro dias, retiraram-se os linfonodos poplíteos dos animais imunizados e avaliou-se a **(A)** porcentagem de células CD4$^+$ provenientes dos camundongos doadores (CD45.1$^+$) e a **(B)** porcentagem de células CD45.1$^+$CD4$^+$CFSE$^+$ em divisão através da diluição de CFSE. Resultados representativos de três experimentos independentes; n= 3 animais por grupo.

Figura 30- SBA-15 na proliferação de linfócitos T CD4$^+$ *in vivo*.



Camundongos C57BL/6 (CD45.2) receberam pela via intravenosa 5 x 10^6 células isoladas e marcadas com CFSE dos linfonodos periféricos de camundongos OT-II (CD45.1.2). Após 24 horas, os animais recipientes foram imunizados com 10 µg de OVA ou 10 µg de OVA: 250 µg de SBA-15 no coxim plantar em volume final de 50 µL. Como controle, camundongos receberam 50 µL de PBS. Passados quatro dias, retiraram-se os linfonodos poplíteos dos animais imunizados e avaliou-se **(A)** o número total de células no linfonodo, **(B)** a porcentagem de células CD4$^+$ provenientes dos camundongos doadores (CD45.1$^+$) e **(C)** a porcentagem de células CD45.1$^+$CD4$^+$CFSE$^+$ em divisão através da diluição de CFSE. Resultados expressos em média ± SD e estatisticamente analisados pelo teste paramétrico *t* de Student $^*p < 0,05$, $^{***}p < 0,001$; e representativos de três experimentos independentes; n= 3 animais por grupo.

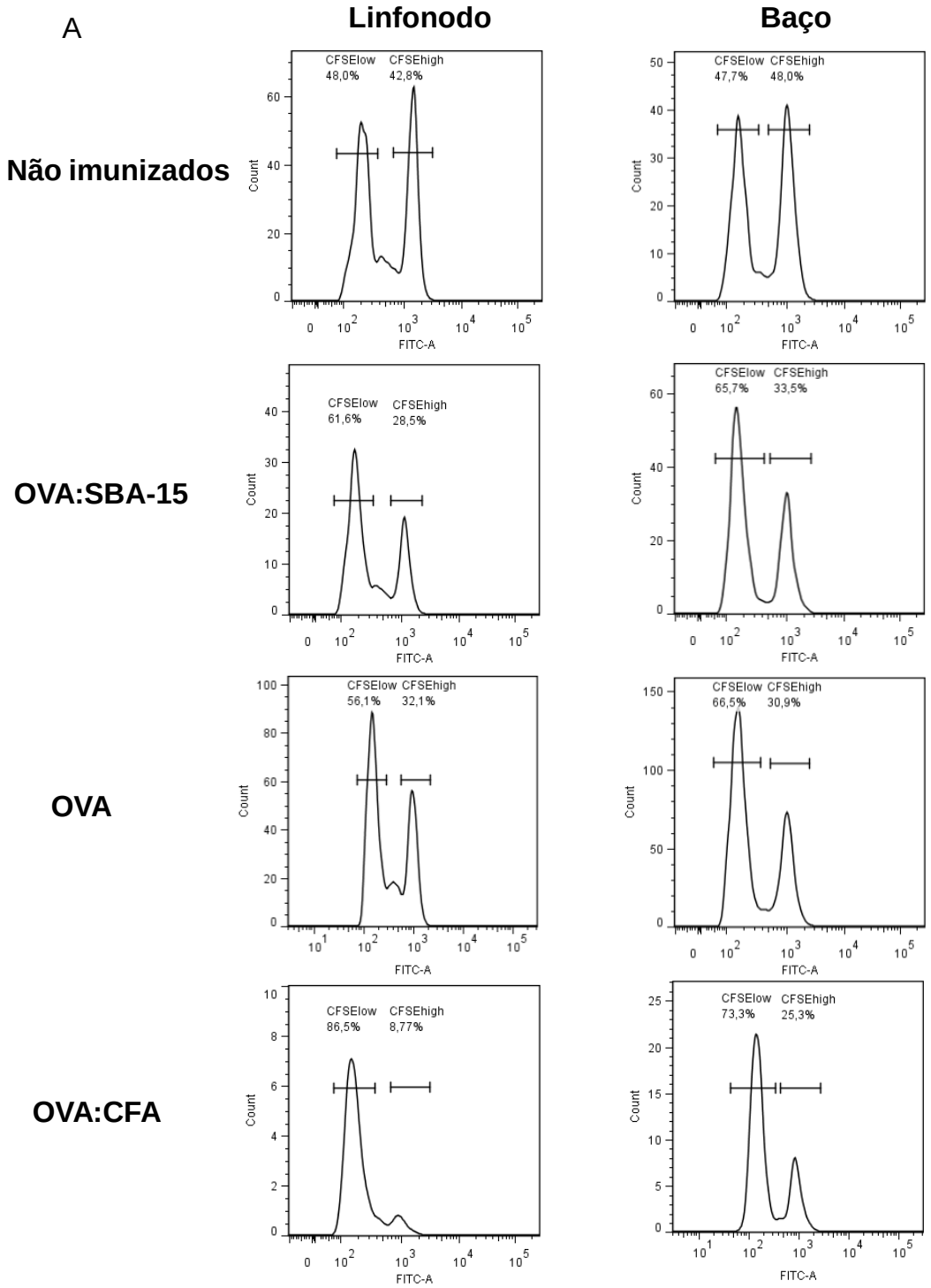
4.8 Ativação de linfócitos T citotóxicos pela SBA-15

A ativação de linfócitos T citotóxicos pela sílica foi avaliada *in vivo* utilizando-se esplenócitos de camundongos C57BL/6 marcados na razão 1: 1 $CFSE^{high}$: $CFSE^{low}$, incubando as células $CFSE^{high}$ por duas horas com o peptídeo $OVA_{257-264}$, e injetando-as (1: 1, 5 x 10^6 células, i.v.) em camundongos C57BL/6 previamente imunizados com 100 µg de OVA, 100 µg de OVA: 2500 µg de SBA-15 ou 100 µg de OVA: 2000 µg de CFA em volume final de 50 µL no coxim plantar. A porcentagem de células-alvo marcadas $CFSE^{high}$ nos linfonodos periféricos e baços foi analisada nos diferentes grupos e sua redução corresponde à morte celular por citotoxicidade.

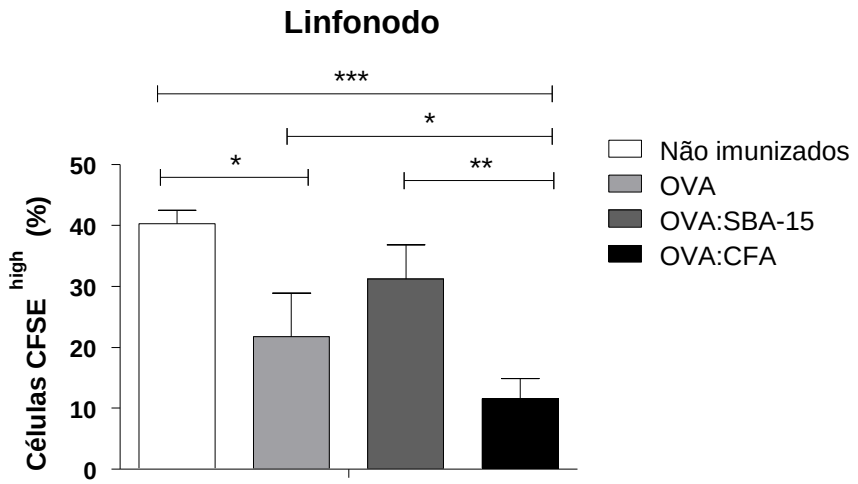
Podemos concluir que a SBA-15 não é capaz de induzir a resposta de linfócitos T citotóxicos, não havendo diferença na porcentagem de células $CFSE^{high}$ quando se compara os grupos imunizados com OVA e OVA:SBA-15 **(Figura 31)**.

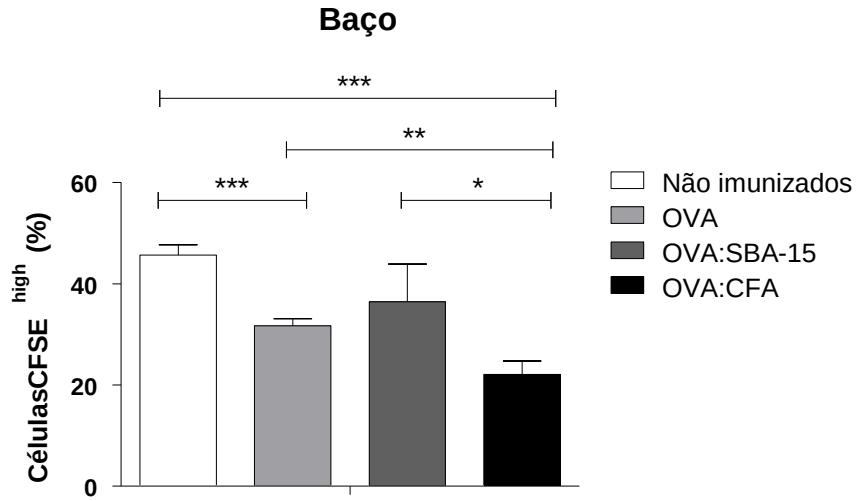
Animais imunizados com OVA: CFA foram utilizados como controle positivo, e apresentaram a maior redução na porcentagem da população de células-alvo $CFSE^{high}$, indicando que houve ativação de T citotóxicos após imunização com esse antígeno **(Figura 31)**.

Figura 31- SBA-15 na ativação de linfócitos T citotóxicos *in vivo*.



B





Camundongos C57BL/6 foram inoculados com 100 µg de OVA, 100 µg de OVA: 2500 µg de SBA-15 ou 100 µg de OVA: 2000 µg de CFA em volume final de 50 µL no coxim plantar. Animais não imunizados foram utilizados como controle. Esplenócitos de C57BL/6 foram isolados e marcados na proporção 1:1 com CFSE 5 µM ($CFSE^{high}$): 0,5 µM ($CFSE^{low}$). As células $CFSE^{high}$ foram incubadas com 3 µM do peptídeo $OVA_{257-264}$ por duas horas a 37 °C. Os esplenócitos $CFSE^{high}$ (5 x 10^6 células) e $CFSE^{low}$ (5 x 10^6 células) foram injetados (i.v.) 1:1 nos camundongos previamente imunizados. Passadas 24 horas, os linfonodos periféricos e baços dos animais recipientes foram retirados e a população $CFSE^{high}$ analisada por citometria de fluxo. Resultados expressos em média ± SD da porcentagem de células $CFSE^{high}$ e $CFSE^{low}$ em **(A)** histogramas e **(B)** gráficos de barras e estatisticamente analisados pelo teste paramétrico *t* de Student $^{*}p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$, $^{***}p < 0,001$; resultados representativos de dois experimentos independentes; n= 3 animais por grupo.

5 DISCUSSÃO

Como demonstrado anteriormente, em diversos estudos, incluindo diferentes vias de imunização e antígenos de natureza distinta, o uso da SBA-15 como adjuvante nas imunizações parenterais foi, mais uma vez comprovado (CARVALHO et al., 2010; SCARAMUZZI, 2009; SCARAMUZZI et al., 2011). Camundongos imunizados pela via subcutânea com HBsAg ou OVA aumentaram significativamente a resposta de anticorpos específicos na presença de sílica. Os níveis séricos de IgG e IgG2a anti-HBsAg foram semelhantes nos grupos imunizados com SBA-15 e $Al(OH)_3$, confirmando que a sílica é tão eficiente quanto o $Al(OH)_3$ nas imunizações parenterais (Figuras 4 e 5). Entretanto, o grupo imunizado com $Al(OH)_3$ apresentou aumento significativo na produção de IgG1, comparativamente a produção de IgG2a, resultado não observado nas imunizações com SBA-15. Esse dado corrobora estudos anteriores que demonstraram a não influência da SBA-15 no direcionamento da resposta imune para T_H2 ou T_H1, ao contrário do $Al(OH)_3$, havendo a produção de ambos isótipos IgG1 e IgG2a, após imunizações com BSA, gama globulina humana, as vacinas contra hepatite A e B, pelas vias subcutânea, intramuscular e oral em animais isogênicos da linhagem BALB/c e heterogêneos SWISS (CARVALHO et al., 2010; SCARAMUZZI, 2009; SCARAMUZZI et al., 2011). Nas imunizações com OVA, os títulos de IgG foram maiores nos animais imunizados pela via subcutânea tendo a sílica como adjuvante, tanto na resposta primária quanto na secundária. Os altos níveis de anticorpos produzidos após dose reforço indicam o sucesso da SBA-15 na promoção de memória imunológica efetiva, o principal objetivo das imunizações (Figura 10).

Numa determinada população natural, a variação fenotípica V_P inclui componentes genéticos V_G e ambientais V_E (BIOZZI et al., 1979), sendo que apenas esse último é passível de ser modulado; os adjuvantes são compostos capazes de atuar nesse segmento da V_P. No caso da produção de anticorpos, $V_G \leq 50\%$ e $V_E \geq 50\%$; daí a relevância de estudos na busca de adjuvantes, determinações das melhores concentrações de antígenos e intervalos de tempos entre doses, idade de aplicação e vias de imunizações.

Pensando na melhoria dos protocolos de vacinação, o emprego da SBA-15 nas imunizações pela via oral tornou-se alvo principal de nossos estudos, por ser próxima das condições naturais de imunização, além de trazer vantagens sócio-

econômicas devido à facilidade de administração, diminuição dos custos operacionais e ser pouco invasiva, reduzindo os efeitos colaterais, como os comumente observados quando das imunizações parenterais. Entretanto, devido ao ambiente gastrointestinal, o desenvolvimento da resposta imune local e sistêmica é prejudicado (BRANDTZAEG et al., 1999; FARIA; WEINER, 2005; JEPSON et al., 1996; KRAEHENBUHL; CORBETT, 2004; SHALABY, 1995; YEH; ELLENS; SMITH, 1998).

Devido às propriedades físico-químicas da SBA-15, acredita-se que os antígenos a ela encapsulados sejam protegidos das desnaturações/alterações dos epítopos causadas durante o tráfego pelo trato gastrointestinal, e influencie positivamente, neutralizando os fatores ambientais na geração de resposta imunológica eficiente pelo aumento do tempo de exposição, captura e proteção dos antígenos pelas células imunocompetentes. O efeito dos fatores ambientais se reflete na precipitação do antígeno na luz intestinal, diminuição da afinidade com a superfície das células M e ocupação das placas de Peyer por peptídeos-epítopos inativos, prejudicando o desenvolvimento da resposta imunológica (CERUTTI, 2008; SHALABY, 1995). São poucas as vacinas licenciadas para a aplicação oral em humanos, entre elas estão vacinas para a poliomielite e os rotavírus, ambas contendo vírus atenuados e apresentando alta imunogenicidade (CERUTTI, 2008).

Nesse contexto, como no presente estudo, o desenvolvimento de vacinas administradas pela via oral visa facilitar a captura dos antígenos pelas células M, aumentar a capacidade fagocítica das APC, modular as respostas de linfócitos B e T a antígeno-específicos, além de proteger o antígeno contra a degradação enzimática, aumentando sua imunogenicidade e garantindo memória eficaz e duradoura.

Diferentes protocolos de imunização com HBsAg indicaram a eficiência da sílica na indução da produção de anticorpos específicos após imunização oral. Camundongos primados pela via oral com SBA-15 e desafiados pela via subcutânea (Esquema 1) apresentaram títulos de anticorpos séricos tão elevados quanto dos animais imunizados com duas doses do antígeno pela via parenteral (Figuras 4, 6 e 7). Contudo, a produção de anticorpos IgA sérico e secretado não indicou diferenças, comparando-se grupos imunizados com ou sem a sílica (Figura 7). Após duas imunizações, exclusivamente pela via oral com a sílica (Esquema 2), os níveis

de anticorpos séricos IgG, IgG1 e IgG2a nesse grupo foram semelhantes ao grupo que recebeu imunizações com SBA-15 ou $Al(OH)_3$ pela via subcutânea (Figura 8).

Frente a esses resultados, como descrito por Scaramuzzi et al. (2011), o uso da SBA-15 como adjuvante oral torna-se extremamente promissor nas imunizações contra hepatite B.

Ao contrário do observado em experimentos prévios administrando BSA, as proteínas recombinantes HBsAg, BfpA e Intimina de *E. coli* encapsuladas à SBA-15 pela via oral (CARVALHO et al., 2010; SCARAMUZZI et al., 2011; VASCONCELLOS et al., 2012), na imunização com OVA não foram detectados anticorpos específicos das classes IgG no soro (Figura 12), e IgA secretada nas fezes dos animais (dados não mostrados). Essa ineficiência da sílica em ativar o sistema imune nas administrações orais de OVA foi comprovada após desafio intraperitoneal com esse imunógeno em hidróxido de alumínio. Todos os grupos de animais previamente imunizados responderam de forma semelhante ao grupo controle que recebeu somente uma vez OVA: $Al(OH)_3$ pela via intraperitoneal (Figura 12B), indicando que não houve indução de memória pela via oral; esse fato pode ser devido à dose de OVA administrada, 100µg, sendo necessário confirmar se o mesmo ocorre para outras concentrações; como exposto, utilizou-se, como controle positivo do experimento, o soro e extrato de fezes de animais previamente imunizados com 1mg de OVA: 10µg de CT, qual seja concentração 100 vezes maior do antígeno e estabelecer-se-á um outro protocolo de imunização oral para verificarmos o real efeito da sílica nesse caso. Outra possibilidade é que a resposta dependa da natureza do antígeno. As proteínas BfpA e Intimina sozinhas já apresentam certa imunogenicidade e o uso da sílica, acredita-se, que potencialize ainda mais a resposta imune.

Demonstrou-se através de ensaios de encapsulação que proteínas como Intimina 1β (16,5 kDa), soro albumina bovina (66 kDa), gama globulina humana (150 kDa) e ovalbumina (45 kDa) (Quadro 2 e Figura 13) são facilmente encapsuladas a SBA-15 (CARVALHO et al., 2010; SCARAMUZZI, 2009; SCARAMUZZI et al., 2011). Acredita-se que o potencial de retenção de moléculas orgânicas deve-se aos grupos silanóis (Si-OH), presentes na sílica, que interagem com as moléculas através de pontes de hidrogênio. Esses grupos OH localizam-se, principalmente, na superfície interna da SBA-15 e constituem a maior parte da área total de superfície desse material poroso (COTEA et al., 2012). A SBA-15 é preparada com o polímero

orgânico P123 ($EO_{20}PO_{70}EO_{20}$) e TEOS; este, depois de hidrolisado, permite a ligação dos grupos silanóis à porção hidrofílica do polímero (EO_{20}) através de ligações de hidrogênio. Dessa forma, ao remover o polímero, os grupos silanóis ficam na superfície interna dos poros e são os responsáveis pela alta área superficial destes materiais. A capacidade da sílica de encapsular e ligar-se a proteínas de natureza distinta, comprovada por nossos resultados, é importante para o sucesso nas imunizações. A proteção de antígenos pela SBA-15 permite a apresentação de epítopos íntegros às células efetoras do sistema imunológico, podendo influenciar, inclusive, no período de estímulo e no tempo de apresentação antigênica. Essa propriedade é especialmente importante nas imunizações pela via oral, devido aos fatores desfavoráveis do trato gastrointestinal como acidez elevada e a intensa ação de proteases (CERUTTI, 2008; SHALABY, 1995).

Quando avaliada a população de células recrutadas para os linfonodos, após inoculação subcutânea de sílica e na ausência de antígenos, verificou-se aumento no número total de células por até 72 horas, sinalizando que, após indução de um processo inflamatório local, houve o desenvolvimento da resposta inata, potencializado pelo adjuvante, caracterizado pela presença de macrófagos e DC (Figura 15C e 15D).

A população de macrófagos $CD11b^{+}F4/80^{+}$, aumentada nas primeiras 24 horas, aliada ao espessamento da pata nesse período, são indicativos de que a SBA-15 é capaz de induzir migração de células da imunidade inata para o local da injeção e, consequentemente, a migração de monócitos e DC para o linfonodo drenante (Figura 15D); tal fato é comprovado pelo aumento da população de células dendríticas maduras $CD11c^{+}MHCII^{high}$, crescente até 72 horas após injeção de SBA-15 (Figura 15D). Experimentos realizados com a sílica e antígenos como OVA e LPS indicaram que a resposta imune é efetiva somente quando os antígenos são administrados encapsulados/ligados a SBA-15; e que a administração da sílica 24 ou 72 horas antes da imunização subcutânea com os antígenos não induz a produção de anticorpos específicos. Ou seja, a ligação antígeno-sílica é fundamental para a indução de um ambiente inflamatório e para o desenvolvimento da resposta de anticorpos (dados não mostrados). O recrutamento de monócitos do sangue e de DC ativadas com fenótipo $CD11c^{+}MHCII^{high}$, que carregam antígenos e expressam as moléculas coestimuladoras necessárias para a ativação de linfócitos T é

fundamental para o sucesso do desenvolvimento da resposta imune adquirida e é uma importante propriedade dos adjuvantes (KOOL et al. 2008).

O hidróxido de alumínio é um dos mais utilizados e um dos poucos adjuvantes licenciados para uso em humanos; considerado seguro e eficiente, atua na indução de inflamação local, estimulando a produção de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, além do recrutamento rápido de monócitos, neutrófilos e eosinófilos nas primeiras 6 horas após administração intramuscular, subcutânea ou intraperitoneal (HOGENESCH et al., 2002; KOOL et al., 2008; LAMBRECHT et al., 2009; MOSCA et al., 2008). Um estudo comparativo entre a resposta inflamatória aguda induzida após administração subcutânea de SBA-15 ou $Al(OH)_3$ em camundongos geneticamente selecionados segundo a alta ou baixa reatividade inflamatória aguda (linhagens AIR_{MAX} e AIR_{MIN}, respectivamente) (IBAÑEZ et al., 1992) indicou que os mesmos tipos celulares são recrutados para o foco inflamatório após a aplicação desses dois adjuvantes, com predomínio de monócitos e neutrófilos nas primeiras 24 horas (SCARAMUZZI, 2009).

Da mesma forma que o hidróxido de alumínio, a SBA-15 não interfere na ativação das DC ou na modulação da expressão de MHCII e das moléculas coestimuladoras CD40, CD80 e CD86 *in vitro,* após 6 horas de estímulo (Figura 16). Porém, a análise de diferentes períodos de estímulo é necessária para melhor caracterizar esse processo. De qualquer forma, assim como o descrito para o hidróxido de alumínio, a ação da SBA-15 *in vivo* é efetiva; nesse caso, a ativação de células da imunidade inata pode ser induzida devido ao microambiente inflamatório, o qual inclui a liberação de sinais por células degeneradas ou por DC indiretamente ativadas (KOOL et al. 2008; SCHMIDT; NINO-CASTRO; SCHULTZE, 2012; SIMMONS et al., 2012). É importante destacar que a sílica não foi tóxica às BMDC, mesmo em altas concentrações, fato que assegura a segurança na aplicação dessas partículas, conforme previamente demonstrado por CARVALHO et al., 2010 em macrófagos, e torna o uso da sílica em imunizações ainda mais promissor (Figura 18).

Ainda *in vitro*, observou-se aumento na produção da citocina pró-inflamatória IL-6 após estímulo das BMDC com concentrações distintas de SBA-15 (Figura 21). Essa é uma citocina pleiotrópica e que influencia o crescimento e migração de células durante a resposta imune, hematopoese e inflamação, interferindo, inclusive, na diferenciação de macrófagos e DC. A IL-6 estimula linfócitos T a produzir IL-4 e,

em contrapartida, inibe a secreção de IFN-γ, promovendo, portanto, a polarização para resposta do tipo T_H2 *in vivo* (FRICK; GRUNEBACH; AUTENRIETH, 2010).

Verificou-se que partículas de SBA-15 são fagocitadas; por BMDC $CD11c^+MHCII^{high}$ *in vitro* (Figuras 19 e 20); comprovando que o uso da sílica pode facilitar a fagocitose de antígenos a ela encapsulados, aumentando a quantidade dos imunógenos capturados e apresentados aos linfócitos T (Figuras 19 e 20). Demonstrou-se, recentemente, que partículas de SBA-15 carregadas com albumina humana marcada com FITC foram eficientemente fagocitadas por células dendríticas humanas derivadas de monócitos (MDDC). A fagocitose foi comprovada por microscopia eletrônica de transmissão, indicando que as partículas localizavam-se em vesículas e não no citosol (VALLHOV et al., 2012). Assim, conclui-se que um dos mecanismos de ação desse adjuvante é a conversão de antígenos solúveis para a forma particulada, o que facilita a fagocitose por macrófagos, células dendríticas e linfócitos B (LAMBRECHT et al., 2009).

Quando analisado o papel da SBA-15 na apresentação antigênica *in vitro* e *in vivo*, verificou-se influência das partículas na ativação dos linfócitos T. Os experimentos *in vitro* com células de animais OT-I e OT-II indicaram, de modo geral, que a sílica potencializa a proliferação de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ incubados por três dias com BMDC previamente tratadas com OVA, OVA:SBA-15 ou seus peptídeo encapsulado ou não à SBA-15 (Figuras 22). Essas diferenças foram significativas na ativação de linfócitos T $CD4^+$, utilizando o protocolo de diluição seriada das BMDC pulsadas com os diferentes tratamentos em cultura. Verificou-se que, BMDC incubadas com $OVA_{323-339}$: SBA-15 foram eficientes na apresentação desse peptídeo aos linfócitos, culminando na maior proliferação dessas células quando se compara BMDC tratadas apenas com o peptídeo (Figura 25C). Além disso, comprovou-se a maior produção de IFN-γ por essas células, tanto nos tratamentos com OVA: SBA-15 quanto com $OVA_{323-339}$: SBA-15 (Figura 26), indicando efeito adjuvante da SBA-15 na ativação de linfócitos T $CD4^+$.

Os experimentos *in vivo* seguiram os mesmos padrões observados nos experimentos *in vitro* (Figuras 27 e 29); entretanto, detectou-se diferença significativa apenas na proliferação de linfócitos T $CD8^+$ (Figura 28C), fato que pode refletir a sensibilidade e/ou limitações do sistema utilizado. Destaca-se o aumento no número total de células no linfonodo poplíteo após imunização com a SBA-15 (Figuras 28A e 30A); esse acréscimo constatado sempre que se imunizou com

antígeno em SBA-15, deve-se, provavelmente, à migração de células da resposta imune inata, especialmente DC, para o linfonodo drenante, e pode ser indicativo de que a sílica desempenhe algum efeito sob esses tipos celulares, exercendo papel importante para o desenvolvimento eficiente da imunidade.

Um fato importante encontrado nos experimentos de proliferação de linfócitos *in vitro* foi à capacidade da sílica em potencializar a expansão clonal de linfócitos com TCR específicos para OVA. Análises indicaram que essas células apresentaram maior número de ciclos de divisão comparativamente ao tratamento com OVA sem o adjuvante (dados não mostrados).

O ensaio específico de citotoxicidade *in vivo* comprovou que a utilização da SBA-15 como adjuvante em imunização subcutânea não foi capaz de induzir a apresentação cruzada da OVA a linfócitos T $CD8^+$; contudo, após imunização com OVA em CFA, adjuvante indutor de CTL e utilizado como controle positivo do experimento, houve a morte das células-alvo $CFSE^{high}$ pulsadas com o peptídeo $OVA_{257-264}$, comprovando que houve a ativação de linfócitos T $CD8^+$ nesse caso (Figura 31). Embora as diferenças não sejam significantes, quando comparados todos os tratamentos, o grupo imunizado com OVA:SBA-15 pareceu inibir a ação de CTL. Comprovou-se, portanto, que a sílica não interfere na apresentação cruzada de antígenos, como o observado em adjuvantes como CFA e os complexos imunoestimuladores (ISCOMS) (ROBSON; DONACHIE; MOWAT, 2008). Talvez por tornar antígenos solúveis em particulados, a apresentação via MHCII seja privilegiada no caso da SBA-15; entretanto, são necessários estudos mais aprofundados para investigar a captura, processamento e apresentação dos antígenos ligados à sílica.

A OVA emulsificada em CFA é fagocitada pelas APC, processada e apresentada via MHCI; linfócitos T $CD8^+$ são ativados e produzem TNF-α e IFN-γ. Estudos indicam que a resposta de CTL em camundongos imunizados com CFA é induzida devido à combinação óleo e micobactéria, componentes da formulação desse adjuvante (TIGNO-ARANJUEZ; LEHMANN; TARY-LEHMANN, 2009; Y; Y; KAPP, 1995); entretanto ainda não foram desvendados os mecanismos envolvidos nesse processo. A indução de resposta de linfócitos T $CD8^+$ representa um dos principais desafios para o desenvolvimento de vacinas protetoras contra vírus e outros patógenos intracelulares, sendo grande o interesse pelo desenvolvimento de

adjuvantes que sejam capazes de induzir a resposta imune mediada por esses linfócitos.

As DC, especialmente aquelas com fenótipo $CD8\alpha^+$ e $CD103^+$, são capazes de exercer o processo conhecido como apresentação cruzada dos antígenos. Neste processo, antígenos exógenos são fagocitados e direcionados para a via de apresentação do MHCI, ativando linfócitos T $CD8^+$. Acredita-se que esses tipos celulares possuam características únicas, como a expressão de receptores específicos para a captura de antígenos, baixa atividade de proteases nos endossomas e expressão exacerbada de moléculas de MHCI e coestimuladoras (NEEFJES e SADAKA, 2012). Alguns adjuvantes, como os complexos imunoestimuladores (ISCOMS), têm alta capacidade de induzir a apresentação cruzada de antígenos proteicos (ROBSON; DONACHIE; MOWAT, 2008); essa propriedade adjuvante é importante para auxiliar o estímulo de CTL e induzir a proteção contra patógenos intracelulares e vírus, especialmente em formulações vacinais baseadas em proteínas isoladas ou recombinantes desses patógenos.

6 CONCLUSÃO

A defesa contra infecções não se deve apenas à ativação de linfócitos B e T antígeno-específicos, mas também à estimulação da resposta imune inata. Os resultados apresentados indicam o potencial da sílica SBA-15 em ativar esse processo inicial da resposta imune, comprovado pelo aumento no número total de células no linfonodo drenante e pelo perfil celular observado após inoculação subcutânea da micropartícula.

Apesar de não se observar o efeito direto da SBA-15 nas células apresentadoras de antígenos, demonstrado pela não influência da sílica na expressão de moléculas de MHCII e coestimuladoras em BMDC de camundongos tratadas com SBA-15 *in vitro*, os resultados preliminares indicam que, devido ao seu potencial de encapsulação de proteínas, a sílica pode auxiliar na proteção e fagocitose dos antígenos, aumentando a disponibilidade dos imunógenos às APC *in vivo*. Ainda, observou-se a interferência da SBA-15 na resposta imune de linfócitos T, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, fenômeno diretamente relacionado à melhor captura e apresentação dos antígenos.

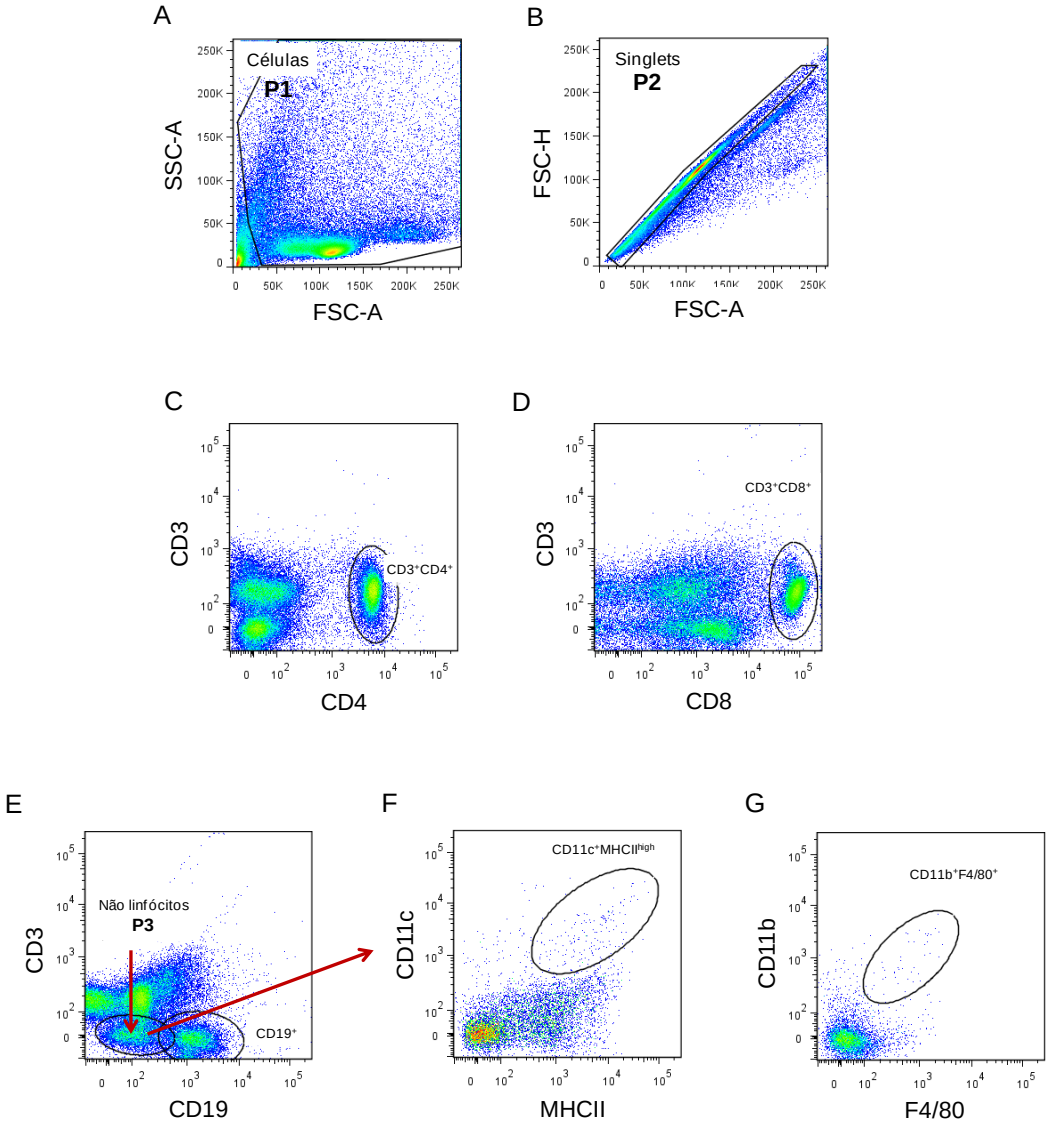
Destaca-se seu efeito adjuvante principalmente para a resposta de anticorpos, com o desenvolvimento de memória imunológica após consecutivas imunizações.

De maneira geral, o modo de ação da sílica inclui a indução de processo inflamatório no local da aplicação que culmina no recrutamento e ativação de APC e a conversão de antígenos solúveis em particulados, facilitando a fagocitose. Assim como o descrito para o hidróxido de alumínio, observou-se predominância da resposta imune humoral; entretanto, um diferencial da SBA-15 é a não polarização para T_H2. Do mesmo modo que o hidróxido de alumínio, a resposta imune de CTL, não é induzida, não ocorrendo influência da SBA-15 na apresentação cruzada de antígenos extracelulares pelas DC.

A sílica mostrou-se segura para aplicação *in vivo* e, frente aos resultados encontrados, é um adjuvante eficiente e que apresenta potencial como adjuvante de mucosas.

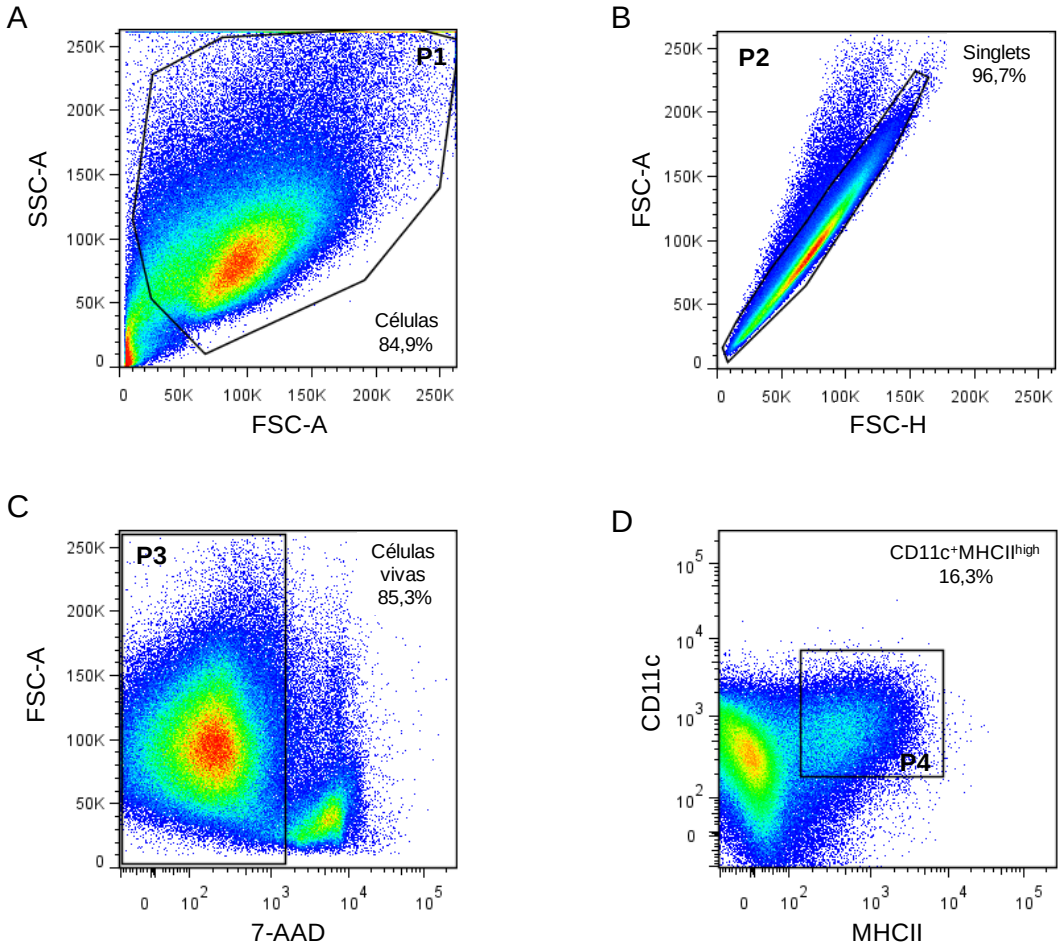
7 FIGURAS SUPLEMENTARES

Figura 1- Gates utilizados para avaliar o recrutamento de células para o linfonodo drenante após inoculação subcutânea de SBA-15.



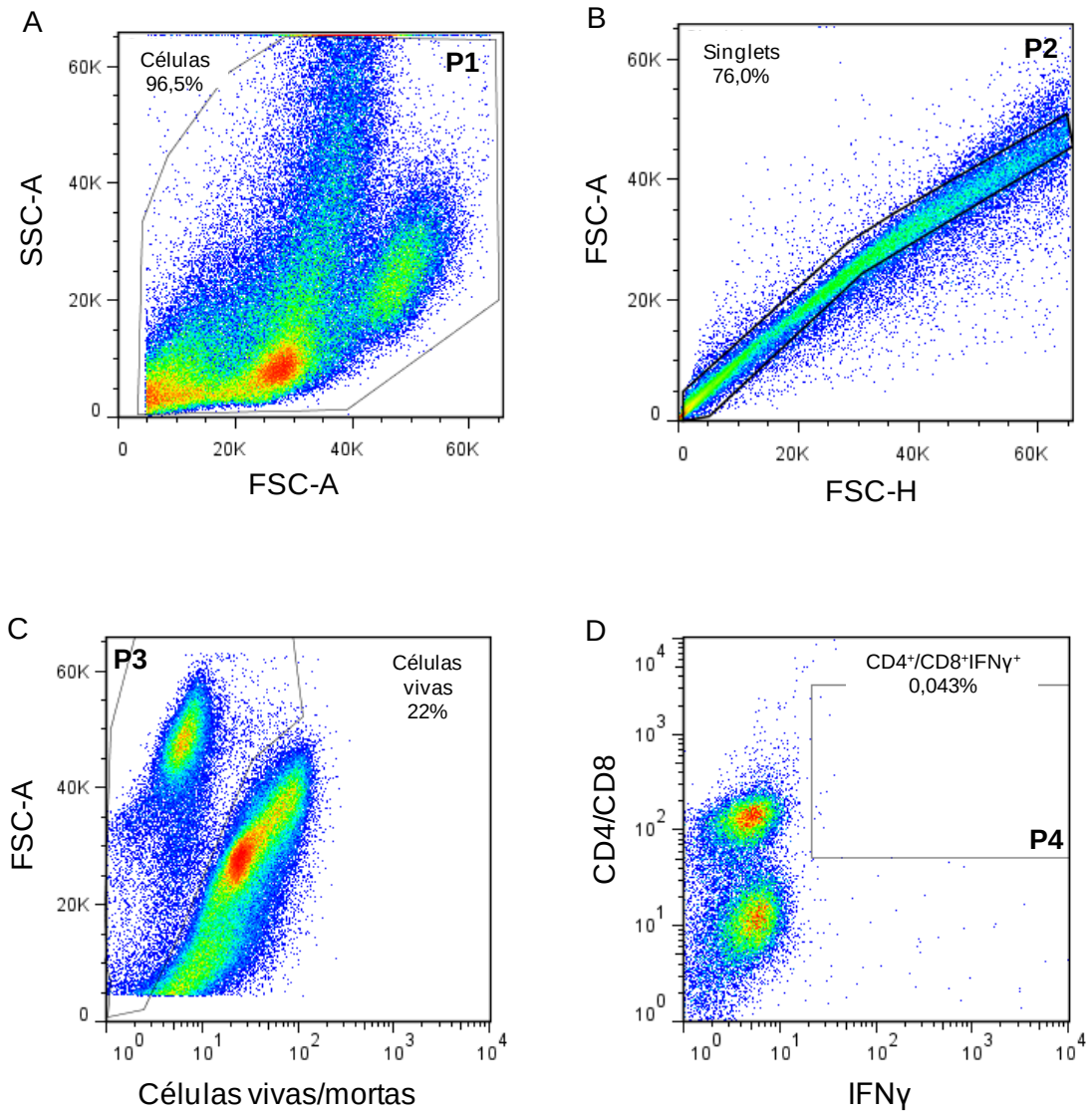
Camundongos C57BL/6 (n=3 por grupo) receberam 1000 µg de SBA-15 em 50 µL de PBS ou PBS como controle, no coxim plantar traseiro direito (s.c.) e, após 24 e 72 horas, os linfonodos poplíteos foram retirados para avaliar a população de células, adquiridas no citômetro de fluxo LSRII. **(A)** P1 - População total de células do linfonodo, *forward scatter* por *side scatter* - área. **(B)** P2- Exclusão dos *doublets*, *forward scatter* - altura por *forward scatter* - área; gate a partir da P1. **(C)** Células $CD3^{+}CD4^{+}$, CD3 (APC-Cy7) por CD4 (PE), gate a partir da P2. **(D)** Células $CD3^{+}CD8^{+}$, CD3 (APC-Cy7) por CD8 (Qdot Bv605-estreptavidina), gate a partir da P2. **(E)** Células $CD3^{-}CD19^{+}$, CD3 (APC-Cy7) por CD19 (V450), e gate na população P3 – não linfócitos, para análise de DC e macrófagos, gate a partir da P2. **(F)** Células $CD11c^{+}MHCII^{high}$, CD11c (PE-Cy7) por MHCII (PerCP-Cy5.5), gate a partir da P3. **(G)** Células $CD11b^{+}F4/80^{+}$, CD11b (AF700) por F4/80 (APC), gate a partir da P3.

Figura 2- Gates utilizados para avaliar a população de células dendríticas por citometria de fluxo.



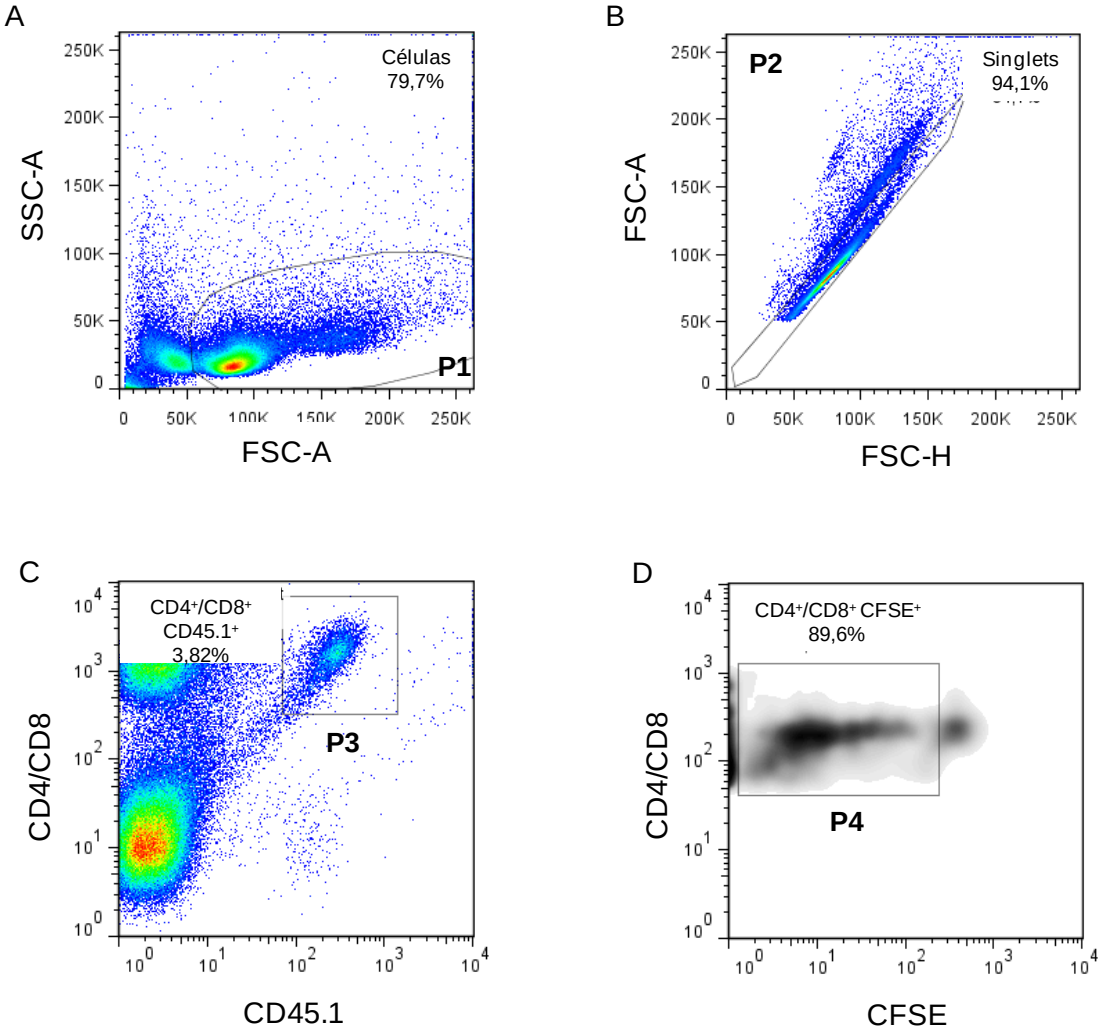
BMDC de camundongos C57BL/6 adquiridas no citômetro de fluxo LSRII. **(A)** P1- População total de células em cultura, *forward scatter* por *side scatter* - área. **(B)** P2 - Exclusão dos *doublets*, *forward scatter* - altura por *forward scatter* - área; gate a partir da P1. **(C)** P3 – Células vivas, 7-AAD (PerCP) por *forward scatter* - área, gate a partir da P2 e **(D)** P4 - células $CD11c^{+}MHCII^{high}$, CD11c (PE-Cy7) por MHCII (V450), gate a partir da P3.

Figura 3- Gates utilizados para avaliar a população de células CD4$^+$ e CD8$^+$ produtoras de IFN-γ por citometria de fluxo.



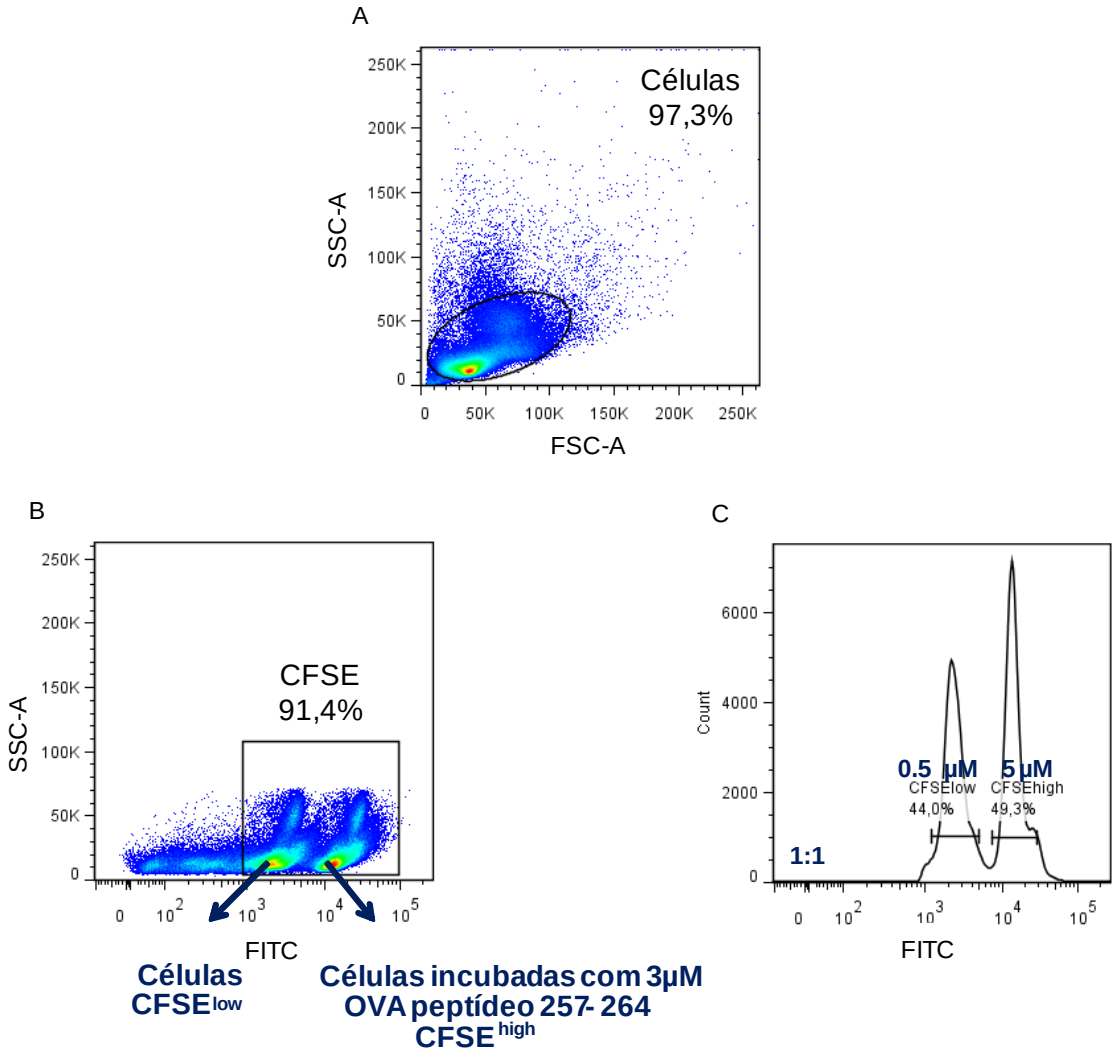
Células CD4$^+$ e CD8$^+$ de camundongos das linhagens OT-I ou OT-II em cocultura com BMDC, cultivadas por três dias e adquiridas no citômetro de fluxo CyAN. **(A)** P1- População total de células em cultura, *forward scatter* por *side scatter* - área. **(B)** P2 - Exclusão dos *doublets*, *forward scatter* - altura por *forward scatter* - área; gate a partir da P1. **(C)** P3 – Células vivas, *Viability Dye* (V506) por *forward scatter* - área, gate a partir a P2 e **(D)** P4 - células CD4$^+$ ou CD8$^+$ (PE) por IFN-γ$^+$ (APC), gate a partir da P3.

Figura 4- Gates utilizados para avaliar a proliferação de células CD4$^+$ e CD8$^+$ específicas para OVA por citometria de fluxo.



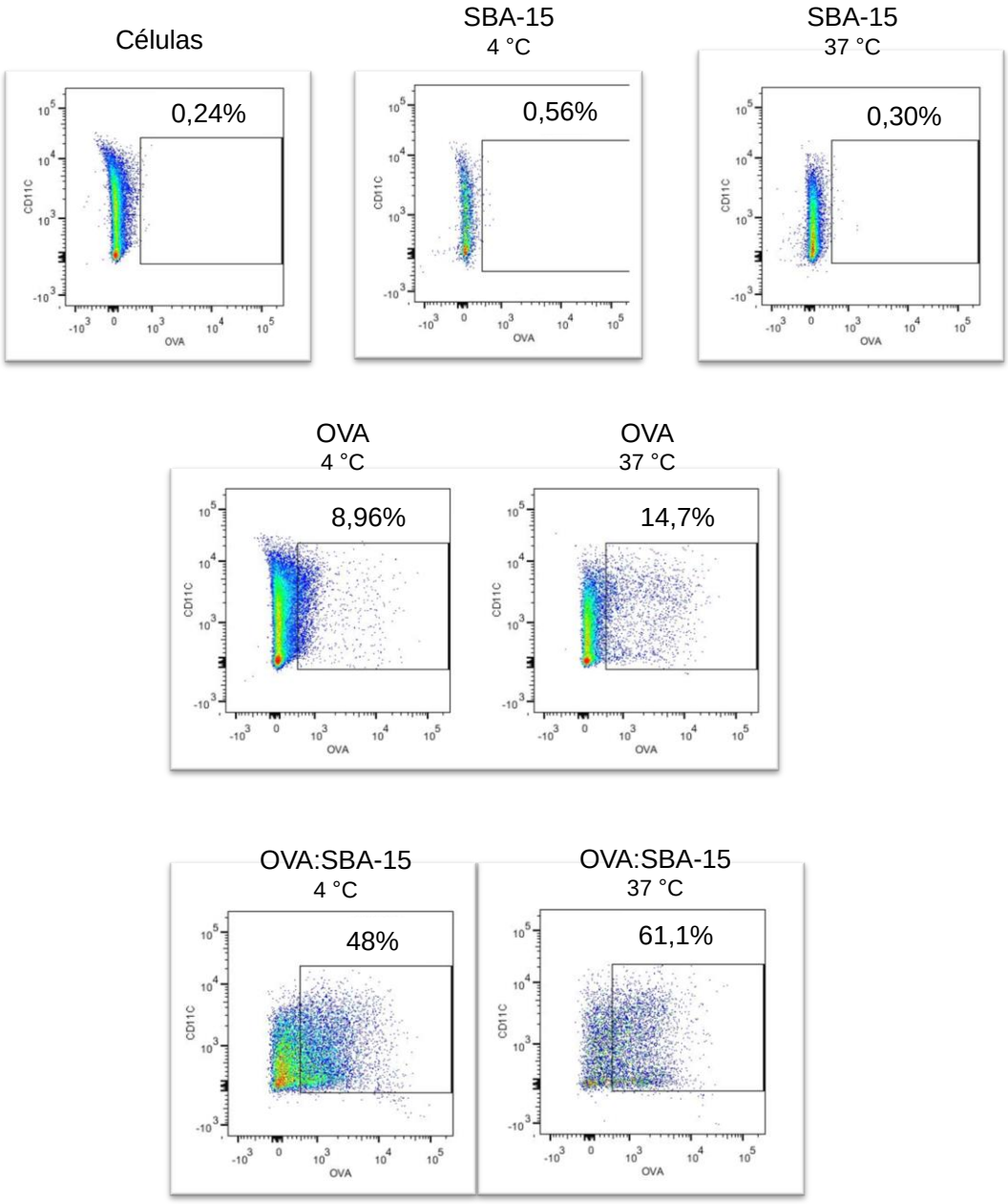
Células CD4$^+$ e CD8$^+$ de camundongos das linhagens OT-I ou OT-II CD45.1 (Ly5.1) transferidas para camundongos C57BL/6 CD45.2 (Ly5.2) posteriormente imunizados com OVA ou OVA:SBA-15. Células do linfonodo poplíteo, quatro dias após imunização s.c. adquiridas no citômetro de fluxo CyAN. **(A)** P1- População total de células do linfonodo, *forward scatter* por *side scatter* - área. **(B)** P2 - Exclusão dos *doublets*, *forward scatter* - altura por *forward scatter* - área; gate a partir da P1. **(C)** P3 – Células dos camundongos doadores CD45.1$^+$ (APC) por CD4$^+$ ou CD8$^+$ (PE), gate a partir a P2 e **(D)** P4 - células CD4$^+$ ou CD8$^+$ (PE) por CFSE$^+$, gate a partir da P3.

Figura 5- Dotplots, histograma e gates utilizados para avaliar a marcação de células do baço de camundongos C57BL/6 com CFSE.



Células marcadas com CFSE 0,5 µM ($CFSE^{low}$) e 5 µM ($CFSE^{high}$), seguindo a proporção 1:1. **(A)** População total de células do baço, *forward scatter* por *side scatter* - área. **(B)** Células marcadas com CFSE, *side scatter* - área por CFSE (FITC). **(C)** Histograma com as células CFSE high e low, gate a partir da população $CFSE^{+}$.

Figura 6- Papel da SBA-15 na fagocitose da proteína OVA marcada com FITC.



BMDC (5 x 10^5 células) foram cultivadas com 5 µg/mL de OVA marcada com FITC, 5 µg/mL de OVA: 125 µg/mL de SBA-15 em 1 mL de meio RPMI completo, por 2 horas a 37 °C, 5% CO_2. Como controle, utilizaram-se DC sem tratamento, DC incubadas com 125 µg/mL de SBA-15, inclusive a 4° C para inibição da fagocitose. Células marcadas com anti-CD11c (APC), anti-MHCII (V450) e 7-AAD (PerCP) e adquiridas no citômetro de fluxo CyAN. População de células vivas e $CD11c^{+}MHCII^{high}$ foi selecionada para as análises. Resultados expressos em *dotplots* CD11c+ (APC) por OVA (FITC). Dados representativos de três experimentos independentes.

REFERÊNCIAS *

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **An. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 593-623, 1999.

AFZALI, B.; LOMBARDI, G.; LECHLER, R. I.; LORD, G. M. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 148, p. 32-36, 2007.

AKDIS, C. A.; OZDEMIR, C.; AKDIS, M. T regulatory cells and their counterparts: masters of immune regulation. **Clin. Exp. Allergy**, v. 39, p. 626-639, 2009.

ALVING, C. R.; PEACHMAN, K. K.; RAO, M.; REED, S. G. Adjuvants for human vaccines. **Curr. Opin. Immunol**, v. 23, p. 1-6, 2012.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, p. 245-252, 1998.

BIOZZI, G.; MOUTON, D.; SANT´ANNA, O. A.; PASSOS, H. C.; GENNARI, M.; REIS, M. H.; FERREIRA, V. C.; HEUMANN, A. M.; BOUTHILLIER, Y.; IBAÑEZ, O. M.; STIFFEL, C.; SIQUEIRA, M. Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in the mouse. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 85, p. 31-98, 1979.

BOTTAZZI, B.; DONI, A.; GARLANDA, C.; MANTOVANI, A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 28, p. 157-183, 2010.

BOVIN, N. V. Natural antibodies to glycans. **Biochemistry**, v. 78, p. 786-797, 2013.

BRANDTZAEG, P.; BAEKKEVOLD, E. S.; FARSTAD, I. N.; JAHNSEN, F. L.; JOHANSEN, F. E.; NILSEN, E. M.; YAMANAKA, T. Regional specialization in the mucosal immune system: whathappens in the microcompartments? **Immunol. Today**, v. 20, p. 141-151, 1999.

BREWER, J. M. (How) do aluminium adjuvants work? **Immunol. Lett.**, v. 102, p. 5-10, 2006

BUONAGURO, F. M.; TORNESELLO, M. L.; BUONAGURO, L. New adjuvants in evolving vaccine strategies. **Expert. Opin. Biol. Ther**., v. 11, p. 827-832, 2011.

BRUSS, V. Hepatitis B virus morphogenesis. **World J. Gastroenterol.**, v. 13, p. 65-73, 2007.

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

CALABRO, S.; TORTOLI, M.; BAUDNER, B. C; PACITTO A.; CORTESE, M.; O´HAGAN, D. T.; DE GREGORIO, E.; SEUBERT, A.; WACK, A. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. **Vaccine**, v. 29, p. 1812-1823, 2011.

CARVALHO, L. V.; RUIZ, R. de C.; SCARAMUZZI, K.; MARENGO, E. B.; MATOS, J. B.; TAMBOURGI, D. V.; FANTINI, M. C.; SANT´ANNA, O. A. Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15. **Vaccine**, v. 28, p. 7829-7836, 2010.

CERUTTI, A. The regulation of IgA class switching. **Nat. Immunol.**, v. 8, p. 421-434, 2008.

COFFMAN, R. L. Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. **Nat. Immunol.**, v. 7, p. 539-541, 2006.

COTEA, V. V.; LUCHIAN, C. E.; BILBA, N.; NICULAUA, M. Mesoporous silica SBA-15, a new adsorbent for bioactive polyphenols from red wine. **Anal. Chim. Acta**, v. 30, p. 180-185, 2012.

COX, J. C.; COULTER, A. R. Adjuvants - a classification and review of their modes of action. **Vaccine**, v. 15, p. 248-56, 1997.

DEFRANCE, T.; TAILLARDET, M.; GENESTIER, L. T-cell independent B cell memory. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 23, p. 330-336, 2011.

DEGN, S. E.; THIEL, S. Humoral pattern recognition and the complement system. **Scand. J. Immunol.**, v. 78, p. 181-193, 2013.

DUPUIS, M.; MURPHY, T. J.; HIGGINS, D.; UGOZZOLI, M.; VAN NEST, G.; OTT, G.; MCDONALD, D. M. Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection. **Cell Immunol.**, v. 186, p. 18-27, 1998.

EDELMANN, R.; TACKET, C. O. Adjuvants. **Int. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 51-66, 1990.

FARIA, A. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance. **Immunol. Rev.**, v. 206, p. 232-259, 2005.

FLACH, T. L.; NG, G.; HARI, A.; DESROSIERS, M. D.; ZHANG, P.; WARD, S. M.; SEAMONE, M. E.; VILAYSANE, A.; MUCSI, A. D.; FONG, Y.; PRENNER, E.; LING, C. C.; TSCHOPP, J.; MURUVE, D. A.; AMREIN, M. W.; SHI, Y. Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. **Nat. Med**, v. 17, p. 479-488, 2011.

FRICK, J. S.; GRÜNEBACH, F.; AUTENRIETH, I. B. Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: A novel role of Toll-like receptors and interleukin-6.
Int. J. Med. Microbiol., v. 300, p. 19-24, 2010.

GAZI, U.; MARTINEZ-POMARES, L. Influence of the mannose receptor in host imune responses. **Immunobiology**, v. 217, p. 554-561, 2009.

GERLICH, W. H.; BREMER, C.; SANIEWSKI, M.; SCHUTTLER, C. G.; WEND, U. C.; WILLEMS, W. R.; GLEBE, D. Occult hepatitis B virus infection: detection and significance. **Dig. Dis.**, v. 28, p. 116-125, 2010.

GLEBE, D. Recent advances in hepatitis B virus research: a German point of view. **World J. Gastroenterol.**, v. 13, p. 8-13, 2007.

GLENNY, A. T. Insoluble precipitates in diphtheria and tetanus immunization. **Br. Med. J.**, v. 2, p. 244, 1930.

HOGENESCH, H. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. **Vaccine**, v. 20, p. 34-39, 2002.

HOGQUIST, K. A.; MORAN, A. E. Treg cells meet their limit. **Nat. Immunol.**, v. 10, p 565-566, 2009.

IBAÑEZ, O. M.; STIFFEL, C.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H. K.; MASSA, S.; De FRANCO, M.; SANT´ANNA, A. O.; DECREUSEFOND, C.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **Eur. J. Immunol.**, v. 2, p. 2555-2563, 1992.

IOSHIMOTO, L. M.; RISSATO, M. L.; BONILHA, V. S.; MIYAKI, C.; RAW, I. I.; GRANOVSKI, N. Safety and immunogenicity of hepatitis B vaccine ButaNG in adults. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 41, p. 191-193, 1999.

ISOBE, Y.; KATO, T.; ARITA, M. Emerging roles of eosinophils and eosinophil-derived lipid mediators in the resolution of inflammation. **Front. Immunol.**, v. 3, p. 270, 2012.

JANSEN, T.; HOFMANS, M. P. M.; THEELEN, M. J. G.; SCHIJNS, V. E. J. N**.** Structure–activity relations of water-in-oil vaccine formulations and induced antigen-specific antibody responses. **Vaccine**, v. 23, p. 1053-1060, 2005.

JEPSON, M. A.; CLARK, M. A.; FOSTER, N.; MASON, C. M.; BENNETT, M. K.; SIMMONS, N. L.; HIRST, B. H. Targeting to intestinal M cells. **J. Anat.**, v. 189, p. 507-516, 1996.

KOOL, M.; SOULLIE, T.; VAN NIMWEGEN, M.; WILLART, M. A.; MUSKENS, F.; JUNG, S.; HOOGSTEDEN, H. C.; HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. Alum adjuvant boosts adaptative immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 205, p. 869-882, 2008.

KOOL, M.; WILLART, M. A.; VAN NIMWEGEN, M.; BERGEN, I.; POULIOT, P.; VIRCHOW, J. C.; ROGERS, N.; OSORIO, F.; REIS E SOUSA, C.; HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. An unexpected role for uric acid as an inducer of T helper 2 cell immunity to inhaled antigens and inflammatory mediator of allergic asthma. **Immunity**, v. 34, p. 527-540, 2011.

KRAEHENBUHL, J. P.; CORBETT, M. Immunology. Keeping the gut microflora at bay. **Science**, v. 303, p. 1624-1625, 2004.

KRESGE, C. T.; LEONOWIEZ, M. E.; ROTH, W. J.; VARTULI, J. C.; BECK, J. S. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. **Nature**, v. 359, p. 710-712, 1992.

KURODA, E.; ISHII, K. J.; UEMATSU, S.; OHATA, K.; COBAN, C.; AKIRA, S.; ARITAKE, K.; URADE, Y.; MORIMOTO, Y. Silica crystals and aluminum salts regulate the production of prostaglandina in macrophages via NALP3 inflammasome-independent mechanisms. **Immunity**, v. 34, p. 514-526, 2011.

LAMBRECHT, B. N.; KOOL, M.; WILLART, A. M. M.; HAMMAD, H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 21, p. 1-7, 2009.

LEBIEN, T. W.; TEDDER, T. F. B lymphocytes: how they develop and function. **Blood**, v. 112, p. 1570-1580, 2008.

LEROUX-ROELS, G. Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. **Vaccine**, v. 28, p. 25-36, 2010.

MAKIDON, P. E.; BIELINSKA, A. U.; NIGAVEKAR, S. S.; JANCZAK, K. W.; KNOWLTON, J.; SCOTT, A. J.; MANK, N.; CAO, Z.; RATHINAVELU, S.; BEER, M. R.; WILKINSON, J. E.; BLANCO, L. P.; LANDERS, J. J.; BAKER, J. R. Pre-clinical evaluation of a novel nanoemulsion-based hepatitis B mucosal vaccine. **Plos One**, v. 3, p. e2954, 2008.

MARTINON, F.; PETRILLI, V.; MAYOR, A.; TARDIVEL, A.; TSCHOPP, J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. **Nature**, v. 440, p. 237-241, 2006.

MATOS, J. R.; MERCURI, L. P.; KRUK, M.; JARONIEC, M. Toward the Synthesis of Extra-Large-Pore MCM-41 Analogues. **Chem. Mater.**, v. 13, p. 1726-1731, 2001.

MATZINGER, P.; KAMALA, T. Tissue-based class control: the other side of tolerance. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 221-230, 2011.

MERCURI, L. P.; CARVALHO, L. V.; LIMA, F. A.; QUAYLE, C.; FANTINI, M. C. A.; TANAKA, G. S.; CABRERA, W. H.; FURTADO, M. F. D.; TAMBOURGI, D. V.; MATOS, J. R.; JARONIEC, M.; SANT´ANNA, A. O. Ordered mesoporous to sílica SBA-15: A new effective adjuvant to induce antibody response. **Small**, v. 2, p. 254-256, 2006.

MOSCA, F.; TRITTO, E.; MUZZI, A.; MONACI, E.; BAGNOLI, F.; IAVARONE, C.; O´HAGAN, D.; RAPPUOLI, R.; De GREGORIO, E. Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 30, p. 10501-10506, 2008.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, p. 173-182, 2006.

NEEFJES, J.; SADAKA, C. Into the intracellular logistic of cross-presentation. **Front. Immunol**., v. 3, p. 1-6, 2012.

NISBET, A. D.; SAUNDRY, R. H.; MOIR, A. J. G.; FOTHERGILL, L. A.; FOTHERGILL, J. E. The complete amino-acid sequence of Hen Ovalbumin. **Eur. J. Biochem.**, v. 115, p. 335-345, 1981.

OUKKA, M. Th17 cells in immunity and autoimmunity. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 67, p. 26-29, 2008. Suppl. 3.

PAPE, K. A.; CATRON, D. M.; ITANO, A. A.; JENKINS, M. K. The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. **Immunity**, v. 26, p. 491-502, 2007.

PELKA, K.; LATZ, E. Getting closer to the dirty little secret. **Immunity**, v. 34, p. 455-458, 2011.

POS, W.; SETHI, D. K.; WUCHERPFENNIG, K. W. Mechanisms of peptide repertoire selection by HLA-DM. **Trends Immunol.**, v. 13, p. 1471-4906, 2013.

RHEE, E. G.; BLATTMAN, J. N.; KASTURI, S. P.; KELLEY, R. P.; KAUFMAN, D. R.; LYNCH, D. M.; LA PORTE, A.; SIMMONS, N. L.; CLARK, S. L.; PULENDRAN, B.; GREENBERG, P. D.; BAROUCH, D. H. Multiple innate immune pathways contribute to the immunogenicity of recombinant adenovirus vaccine vectors. **J. Virol.**, v. 85, p. 315-323, 2011.

ROBSON, N. C.; DONACHIE, A. M.; MOWAT, A. M. Simultaneous presentation and cross-presentation of immune-stimulating complex-associated cognate antigen by antigen-specific B cells. Eur. J. Immunol., v. 38, p. 1238-1246, 2008.

ROMAGNANI, S. Regulation of T cell response. **Clin. Exp. Allergy**, v. 36, p. 1357-1366, 2006.

ROMEU, B.; GONZALEZ, E.; LASTRE, M.; PÉREZ, O. Can mucosal adjuvants contribute to the induction of immunological memory induced via unconjugated T-cell-independent antigens? **J. Drug Target.**, v. 20, p. 502-508, 2012.

RUSSEL, J.H.; LEY, T.J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 323-370, 2002.

SANT´ANNA, O. A.; FERREIRA, V. C.; REIS, M. H.; GENNARI, M.; IBAÑEZ, O. M.; ESTEVES, M. B.; MOUTON, D.; BIOZZI, G. Genetic parameters of the polygenic regulation of antibody responsiveness to flagellar and somatic antigens of salmonella. **J. Immunogenet.**, v. 9, p. 191-205, 1982.

SCARAMUZZI, K. **Efeito adjuvante da sílica mesoporosa nanoestruturada SBA-15 na imunização pela via oral**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SCARAMUZZI, K.; OLIVEIRA, D. C. A.; CARVALHO, L. V.; TAMBOURGI, D. V.; TENÓRIO, E. C. N.; RIZZI, M.; MUSSALEM, J.; FANTINI, M. C. A.; BOTOSSO, V. F.; SANT´ANNA, A. O. Nanostructured SBA-15 silica as an adjuvant in immunizations with hepatitis B vaccine. **Einstein**, v. 9, p. 436-441, 2011.

SCHIJNS, V. E. J. N.; DEGEN, W. G. J. Vaccine immunopotentiators of the future. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 82, p. 750-5, 2007.

SCHMELTZER, P.; SHERMAN, K. E. Occult hepatitis B: clinical implications and treatment decisions. **Dig. Dis. Sci.**, v. 55, p. 3328-3335, 2010.

SCHMIDT, S. V.; NINO-CASTRO, A. C.; SCHULTZE, J. L. Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. **Front. Immunol**., v. 3, p. 1-17, 2012.

SEUBERT, A.; MONACI, E.; PIZZA, M.; O´HAGAN, D. T.; WACK, A. The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 180, p. 5402-5412, 2008.

SEUBERT, A.; CALABRO, S.; SANTINI, L.; GALLI, B.; GENOVESE, A.; VALENTINI, S.; APREA, S.; COLAPRICO, A.; D´ORO, U.; GIULIANI, M. M.; PALLAORO, M.; PIZZA, M.; O´HAGAN, D. T.; WACK, A.; RAPPUOLI, R.; DE GREGORIO, E. Adjuvanticity of the oil-in-water emulsion MF59 is independente of Nlrp3 inflammasome but requires the adaptor protein MyD88. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 108, p. 11169-11174, 2011.

SHALABY, W. S. Development of oral vaccines to stimulate mucosal and systemic immunity: barriers and novel strategies. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v.74, p. 127-134,1995.

SHEN, D. T.; MA, J. S.; MATHER, J.; VUKMANOVIC, S.; RADOJA, S. Activation of primary T lymphocytes results in lysosome development and polarized granule exocytosis in $CD4^+$ and $CD8^+$ subsets, whereas expression of lytic molecules confers cytotoxicity to $CD8^+$ T cells. **J. Leukoc. Biol.**, v. 80, p. 827-837, 2006.

SHILOVA, N.; HUFLEJT, M. E.; VUSKOVIC, M.; OBUKHOVA, P.; NAVAKOUSKI, M.; KHASBIULLINA, N.; PAZYNINA, G.; GALANINA, O.; BAZHENOV, A.; BOVIN, N. Natural antibodies against sialoglycans. **Top. Curr. Chem.**, 2013. In press.

SIMMONS, D. P.; WEARSCH, P. A.; CANADAY, D. H.; MEYERSON, H. J.; LIU, Y. C.; WANG, Y.; BOOM, W. H.; HARDING, C. V. Type I IFN drives a distinctive dendritic cell maturation phenotype that allows continued class II MHC synthesis and antigen processing. **J. Immunol.**, v. 188, p. 3116-3126, 2012.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, p. 427-439, 2010.

SWANSON, C. L.; PELANDA, R.; TORRES, R. M. Division of labor during primary humoral immunity. **Immunol. Res.**, 2012. doi: 10.1007/s12026-012-8372-9.

THOELEN, S.; DE CLERCQ, N.; TORNIEPORTH, N. A prophylactic hepatitis B vaccine with a novel adjuvant system. **Vaccine**, v. 17, p. 2400-2403, 2001.

TIGNO-ARANJUEZ, J. T.; LEHMANN, P. V.; TARY-LEHMANN, M. Dissociated induction of cytotoxicity and DTH by CFA and CPG. **J. Immunother.**, v. 32, p. 389-398, 2009.

VALLHOV, H.; KUPFERSCHMIDT, N.; GABRIELSSON, S.; PAULIE S.; STRØMME, M.; GARCIA-BENNETT, A. E.; SCHEYNIUS, A. Adjuvant properties of mesoporous silica particles tune the development of effector T cells. **Small**. v. 8, p. 2116-2124, 2012.

VASCONCELLOS, H. L.; SCARAMUZZI, K.; NASCIMENTO, I. P.; Da COSTA FERREIRA, J. M.Jr.; ABE, C. M.; PIAZZA, R. M.; KIPNIS, A.; DIAS DA SILVA, W. Generation of recombinant bacillus Calmette-Guérin and *Mycobacterium smegmatis* expressing BfpA and intimin as vaccine vectors against enteropathogenic *Escherichia coli*. **Vaccine**, v. 41, p. 5999-6005, 2012.

VOS, Q.; LEES, A.; WU, Z. Q.; SNAPPER, C. M.; MOND, J. J. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. **Immunol. Rev.**, v. 176, p. 154-170, 2000.

WEST, D. J.; CALANDRA, G. B. Vaccine induced immunologic memory for hepatitis B surface antigen: implications for policy on booster vaccination. **Vaccine**, v. 14, p. 1019-1027, 1996.

Y, K.; Y, L.; KAPP, J. A. Ovalbumin injected with complete Freund´s adjuvant stimulates cytolytic responses. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, p. 549-553, 1995.

YANG, H.; COOMBS, N.; OZIN, G. A. Morphogenesis of shapes and surface patterns in mesoporous silica. **Nature**, v. 386, p. 692-695, 1997.

YEH, P.; ELLENS, H.; SMITH, P. L. Physiological considerations in the design of particulate dosage forms for oral vaccine delivery. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 34, p. 123-133, 1998.

ZHAO, D.; FENG, J.; HUO, Q.; MELOSH, N.; FREDRICKSON, G. H.; CHMELKA, B. F.; STUCKY, G. D. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. **Science**, v. 279, p. 548-552, 1998.

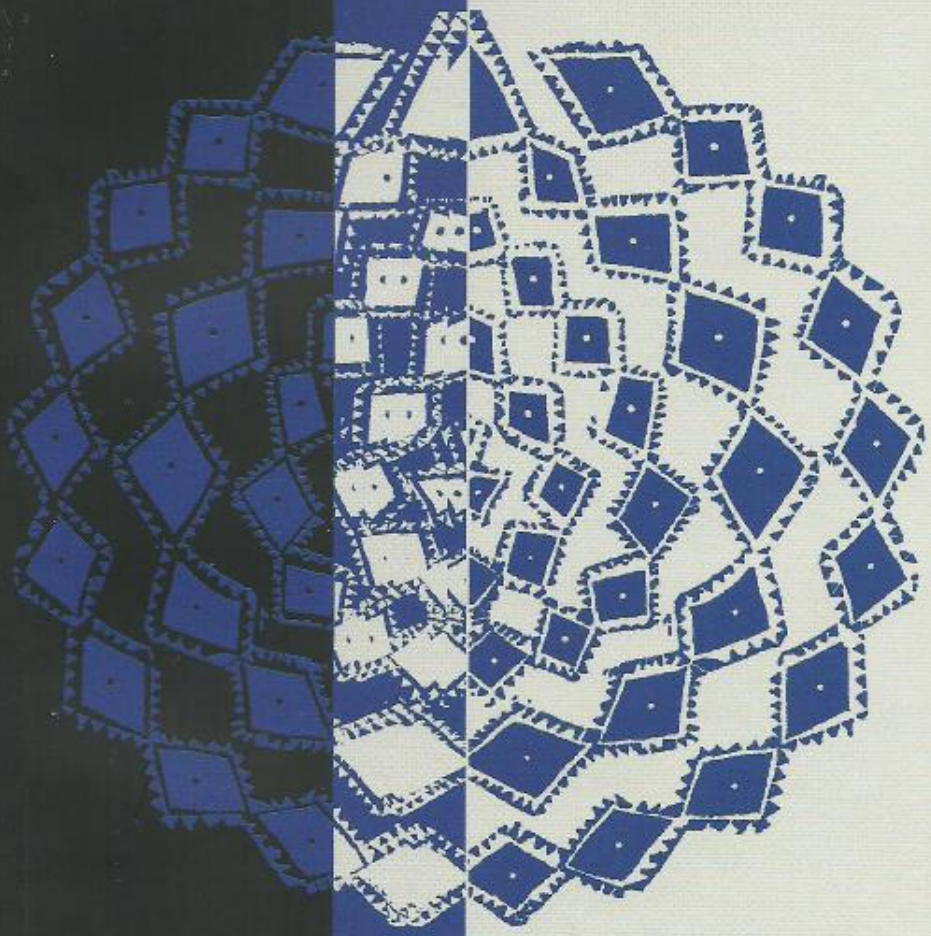
APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo:

SCARAMUZZI, K.; PAGANI, E.; SCIVOLETTO, R.; FANTINI, M.C.A.; SANT'ANNA, O.A. Relato de caso. Uma história contada no futuro: complexo imunogênico constituído por antígenos vacinais adsorvidos/encapsulados em sílica mesoporosas nanoestruturada. **Cadernos da História da Ciência – Instituto Butantan,** v. 5, n. 2, p. 57-63, 2009.

Volume 5 – Número 2
Julho / Dezembro 2009

Cadernos de História da Ciência
Instituto Butantan



Práticas e Políticas de Inovação Tecnológica e o SUS

Laboratório de
História da Ciência
INSTITUTO BUTANTAN

Relato de caso

Uma história contada no futuro: complexo imunogênico constituído por antígenos vacinais adsorvidos/ encapsulados em sílica mesoporosa nanoestruturada

A story told in future: complex incorporated by antigens immunogenic Vaccine Adsorbed / Encapsulated mesoporous silica nanostructured

Karina Scaramuzzi[1]
Eduardo Pagani[2]
Regina Scivoletto[2]
Márcia Carvalho de Abreu Fantini[3]
Osvaldo Augusto Sant'Anna[1]

Palavras-chave: Inovação tecnológica, conhecimento científico, nanovacinas, antígenos vacinais encapsulados

Keywords: *Technological innovation, scientific knowledge, nanovacinas, vaccine antigens encapsulated*

Introdução

Além de manter a homeostasia do organismo, a função do sistema imune é garantir a proteção mais eficaz de indivíduos, numa população natural, contra os mais diversos tipos de agentes infecciosos. As plasticidade e diversidade das estruturas, dos mecanismos e dos processos imunobiológicos que regem a resistência a infecções e toxinas foram sendo reconhecidos e estabelecidos num passado recente, mais precisamente no decorrer dos últimos 50 anos.

[1] Laboratório de Imunoquímica, Instituto Butantan
[2] Laboratório Cristália
[3] Laboratório de Cristalografia, Instituto de Física, Universidade de São Paulo

Os processos infecciosos são, provavelmente, a principal origem de pressão seletiva sobre a evolução do sistema imune com suas redes de células e moléculas que interagem no desenvolvimento de respostas aos agentes estranhos. E, vice-versa, a rede imunológica funcional exerce seleção sobre as características de virulência, infectividade e toxicidade dos microrganismos. Mais ainda, determinando a sobrevivência desses, bem como para cada segmento da resposta imune do hospedeiro, há uma gama de fatores resultantes da participação de componentes genéticos e ambientais. Portanto, a resposta imune é resultante da co-evolução, durante longos anos, tanto de vertebrados como de microrganismos, e inclui o estabelecimento de relações comensais e simbióticas constantes. As características genéticas, os mecanismos operacionais, o complexo de efeitos pleiotrópicos do sistema imune serão afetados, em especial, pelas experiências prévias dos indivíduos com moléculas presentes em microrganismos, ou administradas através de vacinações.

Na quase totalidade das populações observa-se distribuições contínuas de fenótipos de resistência natural ou adquirida a diferentes infecções. Quanto aos patógenos, para as mais distintas características como expressões antigênicas diversas, índices de endemicidade, infectividade, virulência, há variações que incluem a diversidade genética constitutiva de uma dada população, bem como influências de fatores exógenos múltiplos. O impacto dos fatores ambientais sobre as variabilidades genéticas individuais, associado aos fenômenos imunobiológicos em populações humanas ou em outras espécies animais, fornecem uma gama de aspectos significativos sobre as adaptações: hospedeiro-microrganismo.

A influência de fatores ambientais no desenvolvimento de moléstias infecciosas de etiologia virais, bacterianas, parasitárias e fúngicas descritas nas últimas décadas, refletem a diversidade e a amplificação crescente das atividades humanas, incluindo desde a introdução de antibióticos e vacinas, até o aumento da densidade populacional resultando em alterações de hábitos e contato. Esses fatores promovem as alterações dos índices de resistência de microrganismos e, de modo abrangente, nas mudanças de ecossistemas naturais, podendo levar à expansão de vetores de agentes patogênicos ao homem e outras espécies animais. Realçamos a influência dos esquemas de vacinação, especialmente abusivos em animais, com relação às doses e intervalos entre imunizações, e pouco estudados para certas vacinas.

Há outros fatores ambientais que atuam sobre a capacidade e intensidade de resposta a um dado imunógeno, modulando características genetica-

mente determinadas. É o caso dos adjuvantes, artificiais ou naturais. Dentre os últimos destacam-se os antígenos independentes do reconhecimento pelos linfócitos T [TI] como os lipopolissacarídeos presentes em bactérias Gram-negativas que, em concentrações elevadas, induzem proliferação policlonal de linfócitos B e, em baixas concentrações induzem anticorpos específicos por ligação com receptores específicos de células B [BCR]. É clássica, também, a capacidade de determinados antígenos TI promoverem a indução de citocinas, em especial INFγ, interferindo na síntese de anticorpos, como o faz o polissacarídeo de Pneumococo que estimula a produção de anticorpos do isótipo IgG2 em humanos. Frações solúveis de suspensões de *Bordetella pertussis* e a porção lipídica de *Mycobacterium tuberculosis* ou *M. bovis* possuem ação adjuvante. Como esses microrganismos, outros tantos devem possuir propriedades adjuvantes, indicando, portanto, que na natureza o sistema imune deve confrontar-se continuamente com estímulos conjugados epítopos-adjuvantes ou epítopos-carregadores. Há ainda os adjuvantes imunológicos artificiais que favorecem a apresentação antigênica e a imunogenicidade sem interferir na especificidade da resposta, como os tradicionais sais de Hidróxido de Alumínio e as misturas óleo-água como o adjuvante de Freund com ou sem *Mycobacterium*, esses utilizados apenas em esquemas de imunização de animais. Além dos adjuvantes, carregadores como lipossomos e microesferas biodegradáveis vêm sendo testados experimentalmente, modulando os fenótipos quantitativamente – nível e duração de respostas – e qualitativamente – isótipos [sinônimo para classe de imunoglobulina – determinada pela região constante da molécula] e citocinas produzidas.

Sílicas mesoporosas altamente ordenadas

No final de 2001, numa das viagens que fazia diariamente entre Campinas e São Paulo, a Professora Márcia Fantini do Instituto de Física da USP contou-me que havia feito um experimento de difração de raios X de uma sílica nanoestruturada, que era muito bonita esteticamente porque lembrava um favo de mel com seus hexágonos de poros perfeitos.

Lembrei-me de um estudo realizado no Laboratório de Imunogenética nos anos 1980 com outro tipo de sílica, a coloidal, que injetada em altas concentrações em camundongos constitutivamente maus produtores de anticorpos, passavam a bons respondedores. A questão central, na época, era de

que os macrófagos, células do sistema imunológico responsáveis por destruir antígenos e microrganismos em geral, nesses animais apresentavam alta capacidade catabólica, não possibilitando que o organismo desenvolvesse resposta imune efetiva. E administrando a sílica coloidal, ocorria bloqueio dessa atividade nos macrófagos e a resposta imunológica seria, digamos, resgatada.

Portanto, havia a possibilidade de que a sílica nanoestruturada pudesse carregar em seus favos um antígeno, uma vacina. Logo tive contato com os Drs. Jivaldo Matos e Lucildes Mercuri do Instituto de Química da USP que produziam esse material, a denominada SBA-15, e com eles e a mestranda Flávia Lima programamos um experimento. A primeira surpresa: ao juntar um volume de SBA-15 com um volume de uma proteína, a resultante não era dois volumes, mas cerca de 1,5; portanto ocorrera adsorção/encapsulação da proteína à sílica. E mais extraordinário, as respostas dos camundongos que respondiam mal, passaram a produzir níveis mais elevados de anticorpos do que aqueles animais que receberam a mesma proteína adsorvida em hidróxido de alumínio [$Al(OH)_3$], o único adjuvante licenciado para uso em humanos. Daí em diante, só tivemos êxito com o emprego dessa sílica. E há mais aspectos bastante gratificantes: essa sílica não é tóxica, não provoca reações locais ou sistêmicas adversas e, de fato, possui potencial para auxiliar na indução dos mecanismos de defesa do organismo quando administrada em associação com vacinas. (Imagem 1)

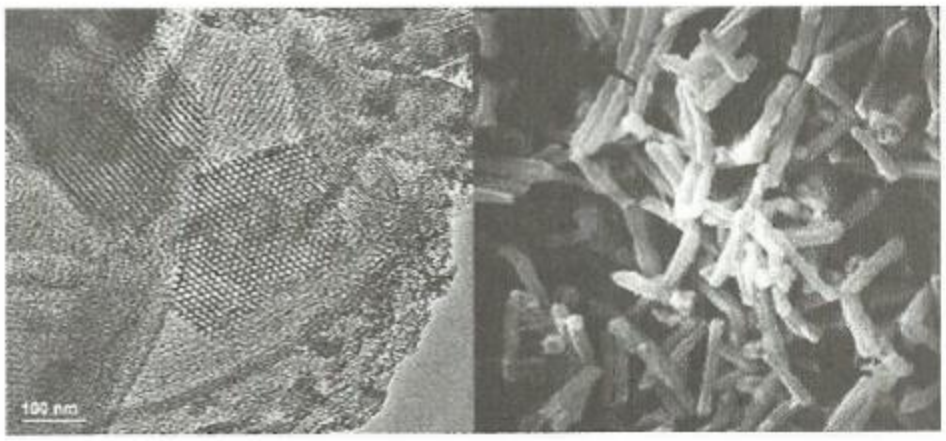


Imagem 1: Microscopia eletrônica de transmissão [TEM] da sílica mesoporosa nanoestruturada SBA-15. [A] Estrutura de poros arranjados hexagonalmente dentro dos tubos cilíndricos de comprimento ~ 2μm . [B] Interior de uma partícula mostrando a macro-porosidade e os tubos cilíndricos de sílica. Tamanho médio da partícula: 30 μm. Diâmetro dos poros: ~10nm. Medidas: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron [LNLS] e POLI [USP].

As sílicas mesoporosas são partículas de óxido de silício [SiO_2] com estrutura altamente organizada que, devido às suas propriedades físico-químicas, apresentam potencial de aplicação em diferentes áreas, e que vêm despertando grande interesse da comunidade científica. Esses materiais são capazes de interagir com átomos, íons e moléculas, não apenas em sua superfície, como também em seu interior. Descrita em 1998, a sílica mesoporosa SBA-15 apresenta estrutura hexagonal com poros altamente ordenados e interligados, paredes relativamente espessas e notável estabilidade térmica, hidrotérmica e mecânica. A SBA-15 é sintetizada em meio ácido, utilizando como agente direcionador de estrutura um polímero orgânico que se liga às espécies de silicatos, via ponte de hidrogênio, formando a sílica mesoporosa; após calcinação resta a sílica inorgânica SBA-15, que forma uma rede com estruturas em forma de tubos longos [da ordem de alguns microns], dispostos hexagonalmente, em um arranjo de poros bastante organizado e uniforme, com diâmetro de cerca de dez nanômetros, unidade de comprimento equivalente à bilionésima parte do metro. Dependendo da disposição dos poros e do tamanho, o material pode ter várias aplicações tecnológicas, sendo usados como catalisadores, sensores, fixação de moléculas de uma substância na superfície de outra substância, de metais pesados, e de poluentes.

Apesar dos vários estudos voltados para a utilização de sílicas como veículo para diferentes substâncias, essas não haviam sido testadas quanto à capacidade de ativar eficientemente as células apresentadoras de antígenos [APC], carrear e liberar imunógenos.

Assim, contando com pesquisadores de diferentes áreas do conhecimento, realizou-se o primeiro estudo sobre a viabilidade de emprego desse material nanoestruturado como adjuvante da imunidade que se realizou no Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, empregando-se a sílica mesoporosa SBA-15. Verificou-se que camundongos geneticamente selecionados para a baixa produção de anticorpos imunizados com Intimina 1β [proteína de *E. coli*] ou veneno total da serpente *Micrurus ibiboboca* encapsulado/adsorvido a SBA-15 apresentaram aumento significativo dos títulos de anticorpos específicos para a proteína e para o veneno da serpente, sendo a resposta secundária semelhante ou mais elevada comparativamente aos animais imunizados com esses imunógenos em $Al(OH)_3$. Ainda, verificou-se que a sílica SBA-15 foi capaz de modular positivamente a resposta imune humoral de camundongos maus respondedores, os quais após imunizações com soro albumina bovina [BSA] pelas vias oral e intramuscular passaram a produzir

títulos de IgG semelhantes aos camundongos bons respondedores. Esse trabalho foi descrito na Monografia de Mestrado de Luciana Vieira Carvalho. Esses dados em conjunto indicam a participação da SBA-15 na ativação do sistema imunológico e na indução de memória, mecanismo essencial para a proteção induzida por processos de vacinação.

Conhecimento e desenvolvimento de uma nanovacina

Em 2005, após apresentação dos primeiros resultados num Simpósio, a farmacologista Professora Regina Scivoletto, levou-me para conhecer o Laboratório Cristália, uma das principais indústrias de produtos químicos e farmacêuticos do Brasil. Os resultados foram apresentados numa reunião à qual, além do Presidente e dos Diretores do Cristália, estavam presentes os Membros do Conselho Científico e, após argüição e discussão dos aspectos essenciais desse novo conhecimento, decidiu-se pelo apoio para o desenvolvimento rumo à eventual aplicação.

Em 12 de setembro de 2005, foi depositada a patente *Complexo imunogênico formado por antígenos vacinais encapsulados por sílica mesoporosa nanoestruturada*, em parceria com o Laboratório Cristália, que recebeu o número PI 0503817-0 e, em novembro de 2008, foi obtida a Patente Internacional. Saliente-se que o Projeto constituía uma das linhas de pesquisas do Programa CEPID-FAPESP – Centro de Toxinologia Aplicada – sediado no Instituto Butantan. Assim, foi possível contar com a FAPESP durante os trâmites que conduziram à Patente.

A parceria com o Laboratório Cristália extrapolou o simples contato formal para desenvolvimento de um eventual produto. Os Drs. Ogari de Castro Pacheco, Roberto Debom, Regina Scivoletto, Jorge Afiune, Eduardo Pagani, em especial, juntaram-se ao projeto de pesquisa, e diria, passaram a integrar nosso núcleo de estudos. Ao longo desses últimos quatro anos, discutiu-se com freqüência os resultados, estabelecemos em conjunto os protocolos e as perspectivas. Além dos estudos sobre os aspectos imunobiológicos relativos à ação da SBA-15, realizaram-se ensaios para avaliar as respostas imunes e inflamatória com a sílica misturada à vacina para Hepatite A, comercializada pela Cristália e com a vacina para Hepatite B, produzida pelo Instituto Butantan. Como os estudos de toxicidade são padronizados e caros, ficaram a cargo da Cristália, que contratou um centro especializado em toxicologia para a realização dos

testes. Confirmando o que havia sido observado, ao longo dos vários experimentos com camundongos, nenhum efeito negativo foi observado.

Ao longo dos estudos, decidimos administrar as vacinas em SBA-15 pela via oral. Locais importantes na indução da imunidade de mucosas compõem o tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal - GALT [*Gut-associated lymphoid tissues*] - e compreendem estruturas como as placas de Peyer no intestino delgado, folículos linfóides isolados no ceco e apêndice e linfonodos mesentéricos. O método de vacinação oral é o mais conveniente no âmbito sócio-econômico; a facilidade de aplicação, o fato de ser pouco invasiva, e de apresentar reduzidos efeitos colaterais, como os comumente observados após imunizações parenterais, são algumas das suas vantagens frente a outras vias de inoculação. Inicialmente acreditava-se que a geração da imunidade de mucosas ocorria através de imunização tópica, contudo vacinas intramusculares ou subcutâneas induzem baixa proteção ao organismo comparando-se às imunizações feitas pelas vias: nasal ou oral, especialmente quando a porta de entrada do agente infeccioso é o trato gastrointestinal. Entretanto, existem limitações para a imunização oral, entre elas encontram-se as alterações causadas nos antígenos durante o tráfego pelo trato gastrointestinal e fatores ambientais como a acidez elevada e a ação de proteases que podem levar a alterações e desnaturações, com subseqüente precipitação do antígeno na luz intestinal, diminuição da afinidade com a superfície das células M e ocupação das placas de Peyer por peptídeos-epítopos inativos, prejudicando o desenvolvimento da resposta imunológica.

A análise dos resultados obtidos a partir das imunizações por essa via com a vacina contra Hepatite A e gama globulina humana, adsorvidas em SBA-15 comprovam a aplicabilidade dessa sílica como suporte para antígenos e evidenciam sua eficácia enquanto adjuvante de mucosas salvaguardando as propriedades imunogênicas e protegendo os antígenos da ação adversa do meio ácido do trato gastrointestinal. Os níveis aumentados de anticorpos específicos séricos e secretores das classes IgA e IgG indicam que a SBA-15 é eficiente na indução de resposta de anticorpos sem polarizar a resposta imunológica à determinada classe de linfócitos. Corroborado pelos títulos de anticorpos protetores, os números aumentados especialmente de linfócitos observados nas placas de Peyer e linfonodos mesentéricos de camundongos imunizados com os antígenos em sílica, indicam que houve proliferação de células imunocompetentes e a potencialização da resposta imune após o uso dessas nanoestruturas como adjuvante. Ainda, a SBA-15

mostrou-se eficiente no recrutamento de macrófagos e células dendríticas, tanto após imunizações pela via oral quanto subcutânea.

Os estudos serão ampliados, enfatizando-se seu papel da SBA-15 sobre as estruturas e células do sistema imunológico do trato gastrointestinal em especial a Lâmina–Própria, bem como sua atuação na manutenção de memória imunológica protetora. Em seu aspecto aplicado, um dos próximos passos conduzirá à pesquisa clínica, que consiste em administrar o complexo imunogênico em seres humanos e observar a ação adjuvante efetiva dessa sílica nanoestruturada.

Nesses quatro anos de parceria foram produzidas as dissertações de Mestrado de Luciana Vieira Carvalho [Bolsista FAPESP] e Karina Scaramuzzi [Bolsista CNPq], defendidas junto ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, e de Francisco Mariano Neto [Bolsista Cristália], junto ao Instituto de Física da USP. Os doutorados de Karina [Bolsa CAPES – Programa INCTTOX] e Francisco [Bolsa CNPq] tiveram início nesse segundo semestre, e Luciana Vieira Carvalho [Bolsista FAPESP] defenderá sua tese ainda em 2010. Além desses Pós-Graduandos, a estudante de Iniciação Científica do Laboratório de Cristalografia, Aline dos Santos Lira Durães, recebe uma Bolsa de Estudos do Laboratório Cristália.

Inovação – ouvindo uma história sendo contada no futuro

A geração de conhecimentos é a verdadeira inovação!

Além de promover a indução de imunidade efetiva de maneira mais homogênea de uma população, evitando que um percentual de pessoas que normalmente apresentam baixa resposta imune passe a ser mais bem protegidas, a utilização desse novo adjuvante, muito provavelmente, reduzirá a concentração de antígenos vacinais, e a diminuição de aplicações de doses de vacina, garantindo uma imunização eficaz. Obviamente, haverá redução de custos de produção e do preço do produto.

Reproduzo as palavras do Governador de São Paulo, José Serra, recentemente durante evento de inauguração do Centro de PD&I do Laboratório Cristália em Itapira, SP:

> "As empresas não sabem utilizar o potencial de inovação propiciado por essas pesquisas. Dessa maneira, o avanço da ciên-

> cia não tem tido efeito sobre o aumento da riqueza nacional que poderia ter, inclusive com novos postos de trabalho. O avanço da ciência no Brasil não vira PIB".

Essa declaração do Governador reforça a posição dos Governos Estadual e Federal que se evidencia na política de C&T que vem sendo aplicadas, pela primeira vez no Brasil nesses últimos anos. Dentre os aspectos positivos, saliente-se a continuidade e expansão dos investimentos em Programas que se consolidaram nos âmbitos do CNPq, FINEP e FAPESP.

Ao contrário do desenvolvimento tecnológico, no qual durante seu processo o acontecer pode ser previsto, o conhecimento científico, de fato, depende do amadurecimento, leva tempo para ser assimilado e não tem hora marcada para consolidar-se. A virtude da paciência, tão rara em tempos recentes, é pouco exercitada. Mesmo nos meios acadêmicos, ambiente propício à geração de conhecimentos que se faz progressivamente e com muita reflexão, não há tempo, pois há que produzir artigos [ou *papers* como dizem], há que conquistarem-se verbas, espaço físico e impor influências. Vaidades e sentimento de posse à parte, pouco sobra para entender o próximo ou as diversidades de pensamento, para exercitar a autocrítica do que se critica, ou simplesmente perguntar-se, *para quem* a pesquisa que realizamos?

Regras, leis, convenções, mitos e lendas, o *Homo sapiens* as estabelece, modifica, elimina... E segue a vida! A noção de progresso, muito recente ao longo da história da humanidade, vincula-se ao ganho, à competição e imediatismo, às vantagens do indivíduo sobre o coletivo. E o bom senso dilui-se ou é sumariamente abolido!

A real e única autonomia é a intelectual! Propriedade intelectual x propriedade de um produto: um falso dilema num emaranhado de regras, barreiras, que acabam por gerar paradoxos que soam, no mínimo, confusos. Como salienta o Dr. Pacheco, Diretor-Presidente do Laboratório Cristália:

> "...investir em pesquisa e inovação não é a prioridade para o empresário brasileiro. Não são raras as vezes que descobertas importantes das nossas universidades passam despercebidas por aqui e acabam virando inovação — que nós depois importamos – nas mãos de empresas multinacionais".

Mas esses são aspectos de outro capítulo que em breve escreveremos. Assim, fica um último e não menos importante registro: *Seja no setor estatal, seja no setor privado, o essencial é trabalhar para tornar o* **bem** *público!*

• *Esse estudo conta com apoio da FAPESP e integra o Subprograma IMUNOLOGIA do INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM TOXINAS [INCTTOX] – CNPq/FAPESP.*

• *M.C.A. Fantini e O.A. Sant'Anna são Pesquisadores do CNPq.*

Data do recebimento do artigo:16/11/2009
Data de aprovação : 25/03/2010

APÊNDICE B – Artigo:

CARVALHO, L.V.; RUIZ, R. de C.; SCARAMUZZI, K.; MARENGO, E.B.; MATOS, J.B.; TAMBOURGI, D.V.; FANTINI, M.C.; SANT´ANNA, O.A. Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15. **Vaccine**, v. 28, p. 7829-7836, 2010.

Vaccine 28 (2010) 7829–7836

Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

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

Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15☆

Luciana V. Carvalho[a], Rita de C. Ruiz[b], Karina Scaramuzzi[a], Eliana B. Marengo[a], Jivaldo R. Matos[c], Denise V. Tambourgi[a], Marcia C.A. Fantini[d], Osvaldo A. Sant'Anna[a,*]

[a] Immunochemistry Laboratory, Butantan Institute, Av. Vital Brazil, 1500, Sao Paulo, SP 05503-900, Brazil
[b] Bacteriology Laboratory, Butantan Institute, Sao Paulo, SP 05503-900, Brazil
[c] Chemistry Institute, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP 05599-970, Brazil
[d] Physics Institute, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP 05599-970, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 24 May 2010
Received in revised form
17 September 2010
Accepted 26 September 2010
Available online 25 October 2010

Keywords:
Adjuvant
Immunogenicity
Immunological memory

ABSTRACT

In 2006, the first report of a nanostructured material as adjuvant was described establishing the effectiveness of the ordered mesoporous SBA-15 silica as an immune adjuvant. The present study evaluated the SBA-15 capacity to modulate the immune responsiveness of High and Low responder mice immunized with BSA encapsulated/adsorbed in SBA-15 by the intramuscular or oral route and the adjuvant effect was compared with the responsiveness induced by BSA in aluminum hydroxide salts or emulsified in Incomplete Freund adjuvant. These results demonstrate the ability of the non-toxic SBA-15 nanoparticles to increase the immunogenicity and repair the responsiveness of the constitutively low responder individuals inducing both the IgG2a and the IgG1 isotypes, independently of the immune cell committed and conditioning the low phenotype. This new adjuvant may reveal novel therapeutic targets for immune modulation and vaccine design.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Generation of specific immune responses against infectious diseases is a primary goal of vaccination and the elucidation of the mechanisms related to antigen recognition offers a variety of strategies for the rational design of vaccines. This knowledge involves the understanding of complex interactions of relevant epitopes with cells, such as macrophages [Mϕ], dendritic cells [DC] and epithelial cells. Nowadays, it is possible to evaluate and select immunogens for vaccine formulations based on the molecular interactions of its components. In this regard, the development and study of adjuvants and delivery systems are crucial to engender relevant biological interactions, leading to proficient antigen traffic and pathway activation for a high immunogenicity [1].

Adjuvants have been developed to improve the immunogenicity of inactive non-replicating vaccines, recombinant products or synthetic peptides increasing the responsiveness to naturally low or non-immunogenic antigens. Moreover, the enhancement of responses in low responder individuals, such as elderly or immunosuppressed and the modulation of inappropriate immune responses would be expected by the use of adjuvants; therefore, they should elicit early, high and long-lasting protective immunity [1–3]. In addition, the releasing of minor antigen amounts inducing a high-quality of immune response with the adjuvant will probably reduce the impact of selective pressure exerted by a vaccine on pathogenicity. Appropriate adjuvants formulation might interfere in activation/modulation of immunocompetent cells such as DC and B lymphocytes enhance the MHC class I presentation for optimal cytotoxic T lymphocyte [CTL] responses, increasing long-term memory and providing a general mild inflammatory stimulus [1–3].

Some substances such as monophosphoryl-lipid A [MPL] [4], saponin QS-21 [5], as well as combination of these compounds [6] are in late stage clinical trials, currently the oil-in-water emulsion MF59 and the aluminum salts such as aluminum phosphate or sulphate are the most applied for human use [7,8]. Nevertheless, aluminum salts induce mainly T_H2 responses, which provide a less efficacious immune response to the majority of licensed vaccines [8]. Thus, the development of less toxic and more effective vaccine adjuvants seems to be of importance.

The ordered mesoporous SBA-15 silica is an efficient adjuvant candidate. This inorganic substance is usually synthesized under acidic conditions by self-assembly of silica species with a tri-block copolymer as structure-directing agent [9,10]. SBA-15 possesses hexagonal porous uniformity, thermal and hydrothermal stabil-

☆ This research is under the scope of the International Patent WO 07 030901.

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3726 7222x2001; fax: +55 11 3726 1505.
E-mail address: gbrazil@usp.br (O.A. Sant'Anna).

0264-410X/$ – see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.vaccine.2010.09.087

ity and exhibits potential applications for selective adsorption and catalysis [11]. In 2006 we demonstrated that SBA(15 behaves as an adjuvant inducing a better or similar response in BALB/c or genetically selected High [H] and Low [L] mice immunized with *E. coli* bacterial protein [*IntI β*] or a complex proteins spectrum of *Micrurus* venom in comparison to a commonly used adjuvant for animal application, such as the complex oil Incomplete Freund Adjuvant [IFA]. Moreover, SBA-15 is able to evoke immunological memory essential for successful vaccinations. These characteristics are believed to be due to the specific adjuvant physical and structural properties [12].

High [H] and Low [L] antibody responder mouse lines, obtained by genetic selective breeding according to these phenotypes, differ in cellular mechanisms responsible for the immunobiological characters according to immunogens and immunization procedures used in each genetic selection experiment [13–15]. In Selection IVA, the difference in antibody responsiveness is mainly due to the antigen catabolism of macrophages and probably other antigen presenting cells [APC] that is higher in L_{IVA} than in H_{IVA} responder lines [13,16]; in Selection III, the H–L difference is due to intrinsic genetic modifications of B lymphocyte potentialities [17]. It was showed that administration of the colloidal silica strongly increases antibody responsiveness in L_{IVA} but not in L_{III} mice; in H_{III} and H_{IVA} the effect of this silica is absent [18]. Moreover, it was reported that exposure to amorphous silica decreased the phagocytic capacity of macrophages and neutrophils [19].

The present study broadens the potential use of adjuvant nanoparticles. Here, the adjuvant effect of SBA-15 was compared with the two other here described: the licensed adjuvant for human use, $Al(OH)_3$, and the potent oil mixture, the IFA. The modulation of L and H mice responsiveness was determined by intramuscular or oral routes, after primary and secondary immunizations with bovine serum albumin [BSA] encapsulated and/or adsorbed in SBA-15, adsorbed in $Al(OH)_3$, or emulsified in IFA. The results clearly ascertain that SBA-15 improves the immunogenicity and positively modulated the immune response of low responder individuals, which were converted into high antibody producers. Moreover, contrasting with the selective T_H2 cell subpopulation activations by IFA and mainly $Al(OH)_3$, the nanostructured silica stimulates mutually T_H1 and T_H2 immune responses. *In vitro* assays with macrophages demonstrated that SBA-15 did not affect cells integrity and the phagocytic potential of these APC of distinct mouse lines [Swiss, L_{III} and L_{IVA}]. Definitively, data confirm that nanostructured SBA-15 is effective as adjuvant for vaccine delivery, able to improve the antibody responsiveness.

2. Materials and methods

2.1. SBA-15 synthesis

SBA-15 was synthesized using poly[ethylene oxide]–poly[propylene oxide]–poly[ethylene oxide] triblock copolymer [Pluronic P123, $EO_{20}PO_{70}EO_{20}$, PM = 5800-BASF], tetraethyl orthosilicate [TEOS] supplied by Fluka, and hydrochloric acid purchased from Fisher Scientific. The synthesis recipe and adsorption characterization of the sample were analogous to those reported elsewhere [11]. The small-angle X-ray scattering [SAXS] characterization was performed as in a previous work [20].

2.2. Animals

Mice were maintained at the animal facility of the Immunochemistry Laboratory of Butantan Institute and caged and handled under ethical conditions, according to international rules of animal care by the International Animal Welfare Recommendations [21]. Female mice genetically selected for high [H] and low [L] antibody response of Selection III [14,17] and IVA [13,14] were obtained from the Immunogenetic Laboratory of Butantan Institute and Swiss mice from the animal facilities of Butantan Institute. Mice were kept in a room with controlled lighting [12 h light/dark cycle], pressure and humidity.

2.3. Cell culture and yeast suspensions

Bone marrow-derived macrophages [BMMϕ] were generated from bone marrow stem cells cultured on 10-cm-diameter plastic plates for 7 days in RPMI 1640 medium containing 15 mM of HEPES, 2 g of sodium bicarbonate/liter, and 1 mM L-glutamine and supplemented with 20% fetal bovine serum and 30% L929 cell conditioned medium [LCCM]. Differentiated BMMϕ were removed from the substrate by vigorous pipetting of ice-cold phosphate-buffered saline. Cells were counted, added [2×10^5 cells/mL] to glass coverslips [13 mm] inserted in 24-well tissue culture plates, and cultured in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum and 5% LCCM. All cultures were kept at 37 °C in a 5% CO_2 air atmosphere.

Dehydrated bakers yeast [*Saccharomyces cerevisiae*] were suspended in PBS, autoclaved, and washed four times with sterile PBS by centrifugation. Prior addition to the cultures, heat killed yeast were disaggregated by passage through 26 G × 1/2 in. needles.

2.4. Preparation of the BSA:SBA-15 immunogenic complex

Bovine serum albumin [BSA] was diluted in phosphate buffered saline [PBS] pH 7.4 was slowly added to the SBA-15 silica [v/v] and maintained during 24 h at 2–8 °C until complete homogenization. Also, BSA was adsorbed in aluminum hydroxide or emulsified in Incomplete Freund adjuvant [Sigma Chemical Co.]. The $Al(OH)_3$ [30 g of $AlNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$/360 mL H_2O d/150 mL of NaOH 1N] was also diluted in PBS to reach final concentration.

2.5. Analysis of the encapsulation and/or adsorption potential of the antigen

The encapsulation and/or adsorption potential of SBA-15 silica was determined *in vitro*. 50 μg/mL of BSA was added in different proportions of SBA-15 [1:5; 1:10; 1:25] diluted in PBS pH 7.4 in final volume of 1 mL [v/v]. Non-encapsulated proteins were separated by centrifugation at 400 × g for 3 min at 25 °C and the supernatant was analyzed. The estimative of BSA concentration [mg/mL] was determined using a spectrophotometer at λ = 280 nm. SBA-15 solution in PBS, was prepared as above described.

2.6. Immunizations and antibody titration

The genetically selected H and L mice, 2–3 months-old [3–5 animals/group], were immunized with 10 μg/animal of BSA in SBA-15, or adsorbed on $Al(OH)_3$, by the intramuscular [IM – 50 μL in each sites] or oral [OR] routes in a final volume of 0.2 mL. The H_{III} and L_{III} mice received a second immunization IM of 10 μg/0.2 mL of BSA in SBA-15. It must be stressed that local tissue damage was not evoked and no granulomas formation was observed when SBA-15 is administered. Groups were also immunized IM with BSA emulsified in IFA. Blood samples were collected at different periods through the retro-orbital venous plexus and the individual serum samples stored at −20 °C.

Levels of IgG anti-BSA, as well as the IgG1 and IgG2a isotypes, were determined by ELISA [22]. Briefly, 96-well microplates [Costar] were coated with 10 μg/mL BSA [Sigma] diluted 100 μL/well of 0.1 M $NaHCO_3^-$ pH 9.6 and incubated overnight

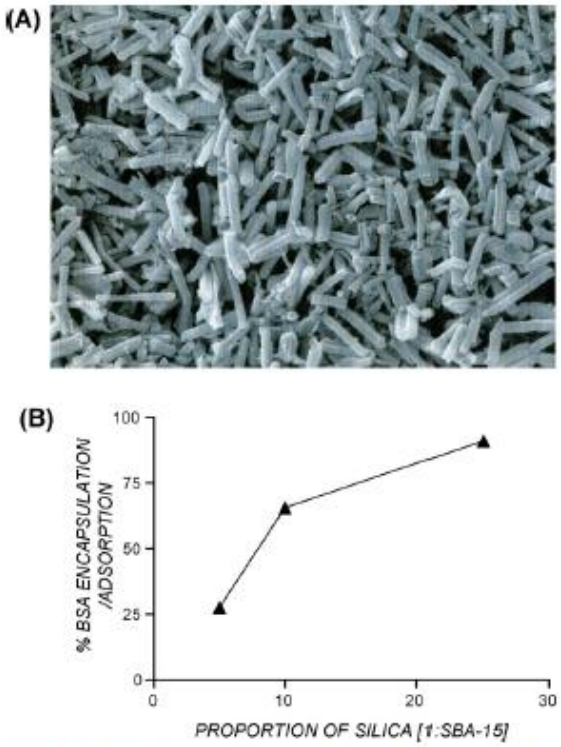


Fig. 1. (A) Characterization of SBA-15 by scanning electron microscopy [SEM]. (B) Percentage of adsorption and/or encapsulation of BSA in SBA-15.

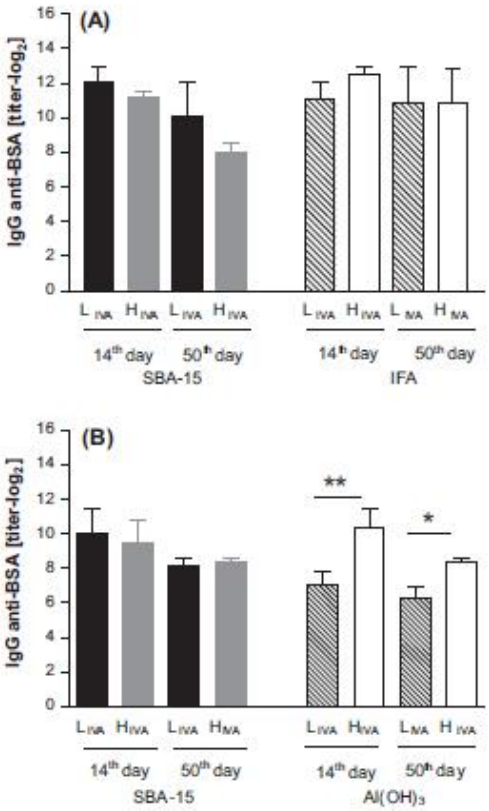


Fig. 2. Anti-BSA IgG antibody production by genetically selected mice for High [H_{IVA}] or Low [L_{IVA}] [n = 4–5/group] antibody response of Selection IVA. (A) Immunization by the intramuscular route with 10 μg of BSA encapsulated/adsorbed in 250 μg of SBA-15 or emulsified on IFA [v/v]. (B) Oral immunization with 10 μg of BSA encapsulated/adsorbed in 250 μg of SBA-15 or adsorbed on 250 μg of $Al(OH)_3$. Antibodies were measured by isotype-specific ELISA in the serum at 14 and 50 days after immunization. *$p < 0.05$, **$p < 0.001$ [unpaired t-test analysis]. Results are representative of 3 independents experiments.

at 4 °C. The plates were washed three times with PBS containing 0.05% Tween 20 [PBS-T] and blocked for 1 h at 37 °C with 200 μL of 0.01% gelatin-PBS-T. Double serial dilutions of serum samples were added and incubated for 1 h at 37 °C and washed three times with PBS-T. After this period, 50 μL of peroxidase-labeled anti-mouse IgG [1:2500], IgG1 [1:1000] or IgG2a [1:1000] diluted in PBS-T was added to each well and plates were incubated for 1 h at 37 °C. After washing, 100 μL of freshly substrate solution [containing 0.5 mg/mL o-phenylenediamine, Sigma, and 0.03% H_2O_2 in citrate/phosphate buffer at pH 4.9] was added to each well, and the plates were then incubated at 37 °C for 10 min and the reaction was stopped with 50 μL of 0.2 M citric acid. Absorbance was measured at λ = 405 nm and the individual antibody titers expressed as [$\log_2[\bar{x} \pm SD]$], calculated as the reciprocal serum dilution giving an absorbance of 20% of the plateau value.

2.7. Effect of SBA-15 on the macrophage phagocytic activity

BMMϕ cultures on coverslips were incubated for 1 h with different concentrations of SBA-15 varying from 20; 50; 100; 200; 500 or 1000 μg/mL. Subsequently, the cells were kept for 1 h at 37 °C in 5% CO_2 atmosphere with *Saccharomyces cerevisiae* at multiplicities of 3 yeast cells/Mϕ in RPMI medium containing 10% SBF. After incubation, the cells were washed twice with Hanks medium to remove the free yeast. After 1, 24, 48 and 72 h of incubation, the cells were washed and fixed with methanol [Merck], stained with May-Grünwald and Giemsa and analyzed by light microscopy. The control group was kept with yeasts only. Cells were counted at a magnification of 1000× with an oil immersion phase contrast objective. At least 200 BMMϕ were scored/coverslip, with frequent focusing. The following were estimated: (a) the percentage of infected cells; (b) the number of yeast internalized *per* macrophages. Each experiment was performed with triplicate sets of wells. All values are the averages of the triplicates from one representative experiment out of two or more performed. The cell viability was determined with the propidium iodide [PI] staining and carried out after 24 h of incubation with different concentrations of SBA-15 [50,100, 200, 1500 μg/mL]. Binding of PI was used to differentiate viable and necrotic cells by flow cytometry. BMMϕ [3×10^5 cells/mL] were cultured in 1 mL of RPMI 1640 medium supplemented with 5% FBS containing different concentrations of SBA-15 [50,100, 200, 1500 μg/mL] for 24 h. After incubation, the cells were incubated with PI as recommended by manufacturer [R&D Systems Inc.] and analyzed in a FACSCalibur [CellQuest software] cell cytometer [BD Biosciences].

2.8. Statistical analysis

The results were expressed as mean [$\bar{x}$] ± standard deviation [S.D.] and statistical significance was set at $p < 0.05$ by the Student's *t*-test.

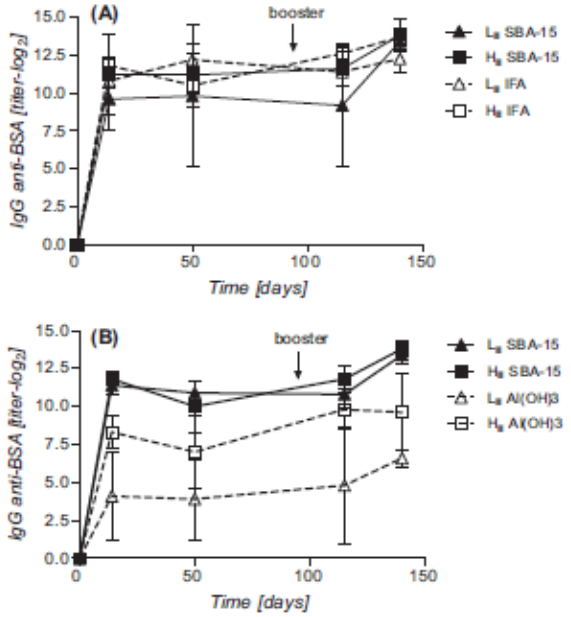


Fig. 3. Anti-BSA IgG antibody production by mice genetically selected for High [H_{III}] or Low [L_{III}] [n = 5/group] antibody response of Selection III. A. Immunization by the intramuscular route with 10 μg of BSA encapsulated/adsorbed in 250 μg of SBA-15 or emulsified on IFA [v/v]. B. Oral immunization with 10 μg of BSA encapsulated/adsorbed in 250 μg of SBA-15 or on 250 μg of $Al(OH)_3$. In both routes, second immunization was achieved with 10 μg/animal, in a final volume of 0.2 mL of BSA, in SBA-15 by the intramuscular route at 95th day. Antibodies were measured by isotype-specific ELISA in the serum at 14, 50, 115 and 140 days after immunization. *$p < 0.05$, **$p < 0.001$ [unpaired t-test analysis]. Results are representative of 2 independents experiments.

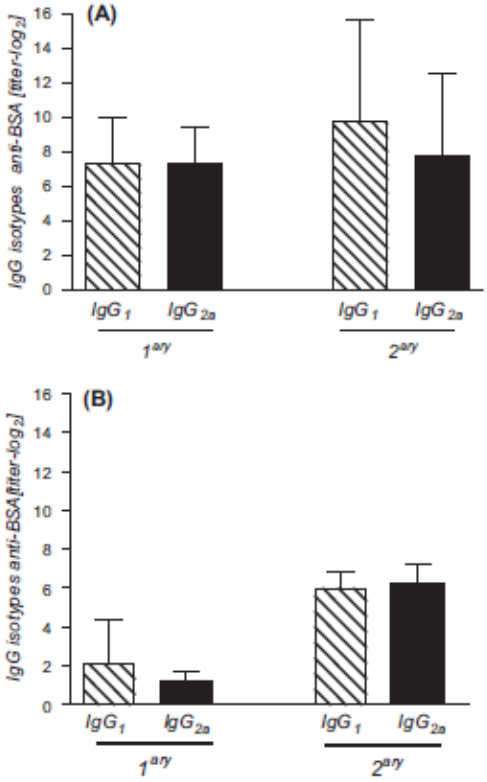


Fig. 4. Titers of IgG1 and IgG2a anti-BSA produced by L_{IVA} mice. (A) Immunization with 10 μg BSA in 250 μg of SBA-15 [v/v] by the intramuscular route. (B) Immunization by the oral via with 10 μg BSA in 250 μg of SBA-15 [v/v]. Antibodies were measured by ELISA at 50th day of the primary response and at 30th day of the secondary response.

3. Results

3.1. Potential of adsorption and/or encapsulation of the SBA-15

The influence of physical and structural properties of SBA-15 on its adjuvant effect was determined. Under the scanning electron microscopy [SEM], a spatial distribution of silica cylinders around 2 μm long are seen. They are formed internally by hexagonally ordered mesopores [mean diameter of 10 nm]. The cylinders appear entangled, as shown in Fig. 1A, through a complementary and large porosity which allows the adsorption and/or encapsulation of antigens outside and inside of them. The diameter of the ordered pores inside the cylinders is between 10 and 12 nm [11] and the ordered porous structure can encapsulate BSA molecules [14 nm × 4 nm × 4 nm], as demonstrated by other authors [23]. Our nitrogen sorption results (Mariano et al., in preparation) also revealed that a pristine SBA-15 sample has a surface area of 668 m^2/g and total pore volume of 1.0 cm^3/g, while the adjuvant embedded with BSA has the surface area decreased to 135 m^2/g and total pore volume to 0.3 cm^3/g.

The adjuvant effect of SBA-15 seems to be connected with the ratio adsorption/encapsulation of antigens; at 1:25 [BSA:SBA-15], the amount of the antigen adsorbed and/or encapsulated was approximately 91% (Fig. 1B).

3.2. Effect of SBA-15 on modulation of the antibody response

In order to evaluate the capacity of the SBA-15 in inducing immuneresponsiveness, the L_{IVA} and H_{IVA} mouse lines were immunized with BSA encapsulated/adsorbed in SBA-15. This adjuvant effect was compared to those of $Al(OH)_3$ or IFA. By the intramuscular route and after 14th day of immunization, SBA-15 silica was competent to improve and positively modulated the anti-BSA antibody responsiveness elicited by the low antibody responder mice, whereas induced similar antibodies titers in the high responders and this profile was kept up to 50th day. No significant differences between SBA-15 and IFA were observed (Fig. 2A). Similarly to the intramuscular route, oral immunization of BSA in SBA-15 in L_{IVA} mice elicited comparable specific serum IgG levels to that obtained in the H_{IVA} mice (Fig. 2B). However, anti-BSA IgG levels of L_{IVA} mice immunized with BSA in $Al(OH)_3$ were approximately 16-fold lower (**$p < 0.001$) than the H_{IVA} mice at day 14 and 4-fold lower in the latter response (*$p < 0.05$) (Fig. 2B). In both routes, inoculation of BSA in PBS elicited only basal antibody levels, thus lower than those observed in SBA-15, IFA and $Al(OH)_3$ immunized mice groups [data not shown].

Since SBA-15 was able to accurate the antibody responsiveness of the constitutively low responder mice eliminating the H–L interline difference in genetic Selection IVA, the effect of SBA-15 was tested on L_{III} and H_{III} mice from another independent genetic Selection III that present intrinsic genetic modifications of their lymphocyte potentialities. As occurred in Selection IVA, the SBA-15 positively modulated the immune response of L_{III} mice that became competent responder presenting similar antibodies levels as the H_{III} mice. Fig. 3A illustrates the primary and secondary anti-BSA IgG

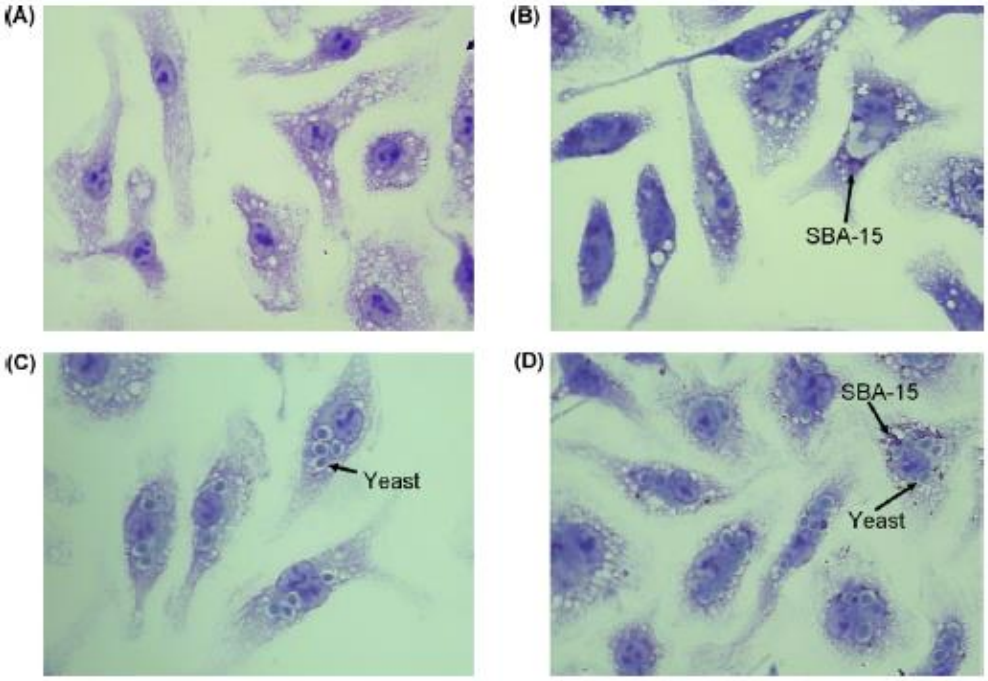


Fig. 5. Effect of SBA-15 on the morphology of macrophage. Light microscopy [cell stained with May-Giemsa. Magnitude: 100×] of morphological configuration and phagocytic activity of L_{III} mice bone marrow macrophages after 24 h. [A] Mϕ; [B] Mϕ + 100 μg/mL SBA-15; [C] Mϕ + yeast; [D] Mϕ + yeast + 100 μg/mL SBA-15.

antibody response elicited by the intramuscular administration of SBA-15 or IFA and no significant differences on the antibody titers were observed between L_{III} and H_{III} mice. As for Selection IVA, animals that received BSA in PBS showed basal immunoglobulin levels [data not shown].

Anti-BSA responses were also evaluated in L_{III} and H_{III} mice immunized by the oral route with the antigen in SBA-15 or $Al(OH)_3$. The IgG antibody titers produced by L_{III} mice immunized with SBA-15 were analogous to those of the high responder line (Fig. 3B). In contrast, $Al(OH)_3$ was unable to enhance humoral response in L_{III} mice. At 14 days post-immunization the L_{III} mice presented specific IgG titers approximately 4 $\log_2$ lower than those produced by H_{III} mice and these differences were 256-fold lower after booster (Fig. 3B).

To determine whether the SBA-15 administration evokes preferential activation of T_H1 or T_H2 response, the IgG isotypes, IgG2a and IgG1, in the primary and secondary responses were evaluated. At 50 days post-primary and 30 days post-secondary vaccination, L_{IVA} mice [n = 4/group] orally immunized with 10 μg of BSA in 250 μg SBA-15 (Fig. 4A) or intramuscularly (Fig. 4B) produced both IgG1 and IgG2a anti-BSA at similar levels. These findings were confirmed during responses to other orally administered immunogens, such as human gamma-globulin, Hepatitis A or B vaccines, in isogenic BALB/c and outbred Swiss mouse lines. Oral immunization in BALB/c mice with human gamma-globulin, Hepatitis A vaccines adsorbed in SBA-15 showed an increase in secretory Immunoglobulin A [2 or 8-fold, respectively] and serum Immunoglobulin G [16 or 2-fold, respectively] production compared with the group immunized with the soluble antigens (Scaramuzzi et al., in preparation).

3.3. *Effect of SBA-15 on morphology and phagocytic activity of macrophage*

To elucidate the mechanism of equivalent induction of antibody production by the SBA-15 adjuvant, the morphology and phagocytic activity of Swiss or L_{III} or L_{IVA} mice Mϕ were evaluated by *in vitro* assays. Increased concentrations [20,50 or 100 μg/mL] of these nanoparticles did not affect the morphology of macrophages from L_{III} (Fig. 5), Swiss or L_{IVA} mice lines [data not shown]. Cell integrity was maintained up to 96 h at various concentrations of SBA-15 [200–1000 μg/mL] and PI assays were performed confirming the non-toxicity of this new adjuvant. In addition, higher concentrations of SBA-15 did not alter the cells integrity. Although not modifying the phagocytic activity of macrophages, higher concentrations of silica [1.5–5 mg/mL] reduced the viability of these cell types. It must be emphasize that the general *in vivo* non-toxic property of these nanoparticles was ascertained during a one year experiment, by administering 250 μg in a group of 15 Swiss 2-month-old mice and measuring weekly their weight and evaluating their morphological aspects; no differences of growth or weight were observed in these SBA-15 treated animals when compared with 10 control Swiss mice that received phosphate-buffer saline [data not shown].

The phagocytic potential and the percentage of *S. cerevisiae* infected Mϕ from L_{III} and Swiss lines, incubated with 200, 500 or 1000 μg/mL of SBA-15 for 1 h, were similar to the control group. In L_{III} macrophages this profile was maintained up to 24 h of incubation, however after 48 and 72 h the percentage of infection was reduced in treated groups, decreasing 15% as compared with the control group (Fig. 6A). Swiss mice Mϕ treated with 200, 500 or

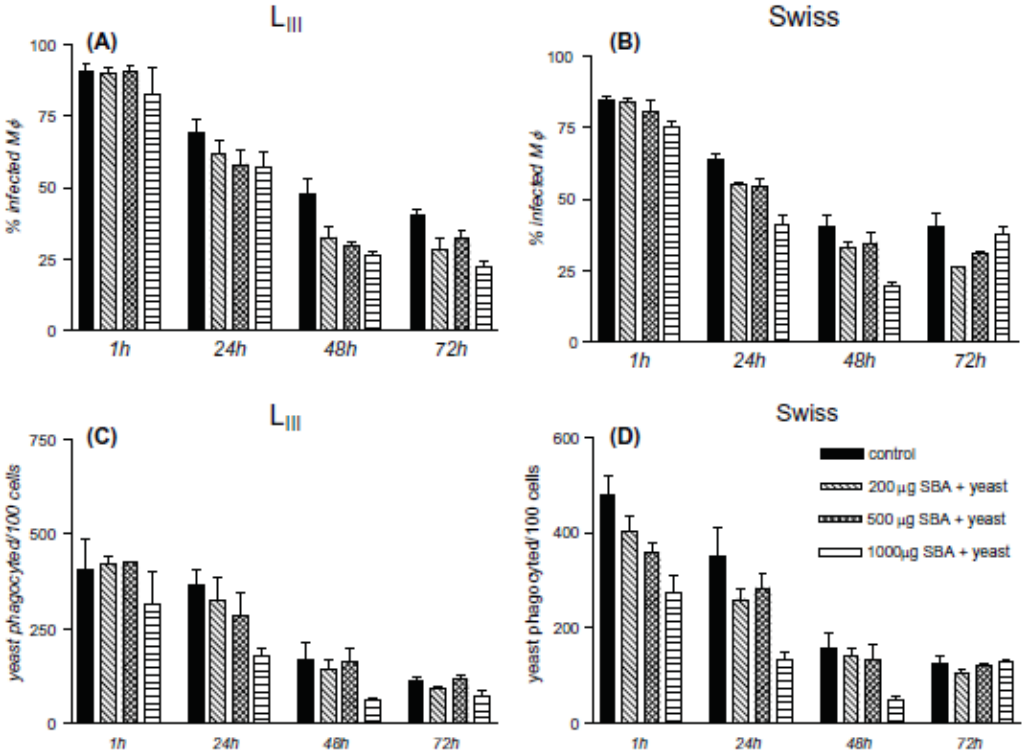


Fig. 6. Effect of SBA-15 on the phagocytic and catabolism activity of L_{III} and Swiss BMMϕ. Percentage of macrophages infected after 1–72 h of incubation with different concentrations of SBA-15 [200–1000 µg/mL] + yeasts or only yeast [control group] in L_{III} mice [A] or Swiss mice [B]. Number of yeasts phagocyted after 1–72 h of incubation with diverse concentrations of SBA-15 [200–1000 µg/mL] + yeasts or only yeast [control group] in L_{III} mice [C] or Swiss mice [D]. The L_{III} and Swiss macrophages results are representative of phagocytic activity of L_{WA} mice and of two independent experiments in triplicate.

1000 µg/mL of SBA-15 for 24 h, the percentage of infected cells decrease 9–23%, contrasting with the control group. After 48 h, the difference was of ~20% only for the group treated with 1000 µg/mL; at 72 h, no distinction was observed (Fig. 6B).

Catabolism was also verified by monitoring the number of yeasts/BMMϕ up to 72 h of infection. The number of yeasts per cell in L_{III} and Swiss cultures treated with diverse silica concentrations decreased as much as in the control group and no inter-group differences were observed (Fig. 6C and D).

4. Discussion

The success of a vaccination is measured by the specificity, magnitude and duration of the protective immunity. Vaccines that contain attenuated pathogens normally do not require adjuvants because they mimic natural infection that, in fact, is the better vaccination process. However, recombinant vaccines often need the addition of exogenous adjuvants to induce potent and persistent immune responses. The role played by particulate antigens delivery depends on the mediation of the effective uptake by APC that have critical importance on the transport of antigens from the periphery to the main organized lymphoid organs [24–26]. Thus, co-delivery of associated or entrapped adjuvant and antigen is a possible path for the enhanced potential of particle-based liberation systems, with the main emphasis on improving liposomal and biodegradable polymer-based vehicles.

Adsorption and encapsulation of antigens by polymers helps to avoid the exposure of immunogens to organic solvents, high shear stresses and to low pH [27]. Briefly, after immunization, the degree of antigen adsorption and/or encapsulation can be modified due to interaction with components of the interstitial fluids. Moreover, previously reported articles highlighted the direct relationship between the percentage of encapsulated antigens and it continuous and/or directed the release by stimulation of the immune system [28]. Our results demonstrated that SBA-15 was able to adsorb and/or encapsulate diverse natural antigens and, probably, enhance the immunity, here represented by the anti-BSA responsiveness (Figs. 1–3). Optimal proportions of adsorption/encapsulation of antigen in silica seem to be related to the physic-chemistry attributes of the immunogens. A series of studies on these physico-chemical characteristics is the purpose of another paper (Mariano et al., in preparation).

The results obtained through phagocytosis assays showed that the SBA-15 was engulfed by macrophages (Figs. 5 and 6) and these data are supported by the literature data [29]. Moreover, those reports demonstrated that the phagocytosis of silica particles, by macrophages, induces the generation of reactive oxygen species in these cells and induces the production of IL-1β in a caspase-1 dependent way via the activation of NALP3 inflamasome [30,31]. Besides, for preliminary data concerning the interaction of SBA-15 and macrophages, further analysis about cytokine production and by antigen presenting cells will clarify mechanisms involving the immunogenicity improvement of the SBA-15 particles.

In 1987, it was clearly demonstrated that the *in vivo* administration of colloidal silica strongly increases antibody responsiveness in the genetically selected L_{IVA} mice, whereas this does not occur in the L_{III} ones [18]. In the former, the higher catabolic Mϕ activity restrain the lymphocytes stimulation being responsible for the weak and transient antibody response of L_{IVA} animals, whereas the persistent immunogenic stimulation is responsible for the strong and long-lasting response of the H_{IVA} mice line [14,15]. Thus, the minimum amount of antigens expressed in the surface of macrophages in low mice generates a non-effective activation of T lymphocytes resulting in a poor antibody production. In fact, this trait must be quite naturally frequent in human and other species. Data in Figs. 2 and 3 support that immunization by the intramuscular route with BSA encapsulated/adsorbed in SBA-15 or emulsified on the IFA were able to eliminate the H–L interlines phenotypic differences in both Selections III and IVA. Concerning to the adequacy of the adjuvant, it is important to remind that oily substances, like IFA, provokes lumps under the skin, while the soluble silica solution is easily absorbed by the muscles. It is noteworthy that the volume used in immunization by intramuscular injection does not avoid muscle damage and any immune bias due to cell necrosis for instance.

By the oral via, the results ascertained that $Al(OH)_3$, the most used adjuvant in human vaccination, is not efficient in providing an efficacious mucosal immune response. Furthermore, it was unable to positively modulate the antibody responsiveness of the low antibody responder individuals (Figs. 2 and 3). Conversely, the positive modulation of the humoral response observed in L mouse lines suggests that antigen encapsulation/absorption in SBA-15 could guarantee a better epitopic recognition by the APC, promoting a successful activation of the immune system. Although no other mucosal adjuvant was compared with the nanostructured silica, differences between $Al(OH)_3$ and SBA-15 indicate that the ordered mesoporous particles is an efficient adjuvant in inducing competent immunity. The SBA-15 physicochemical characteristics possibly will prevent the antigen degradation by the stomach acid when administered by the oral route. In addition, supported by the high titers of protective serum and secretory antibodies, the augmented numbers of T and specially B lymphocytes observed at Peyer's patches and mesenteric lymphonodes from BALB/c mice immunized with Hepatitis A vaccine or human gamma-globulin on SBA-15 indicated that there were proliferation and recruitment of immunocompetent cells, as well as the enhancement of the immune response, after the employment of these nanoparticles as an oral adjuvant (Scaramuzzi et al., in preparation).

Upon interaction with cognate antigen presented by antigen-presenting cells, $CD4^+$ T cells can differentiate into a variety of effector subsets, including classical T_H1 and T_H2 cells and the more recently defined T_H17 cells. The T_H1 immune response is attended by IL-2 and IFN-γ secretion, leading to cell-mediated immune response and expressed by complement-fixing murine IgG2a, IgG2b and IgG3 isotypes. Conversely, the T_H2 cell mediated response is associated with expression of IL-4, IL-5 and IL-13, and the IgG1, IgA and IgE antibodies in mice. T_H17 cells produce IL-17, IL-17F and IL-22 and play important roles in clearance of extracellular bacteria and fungi, especially at mucosal surfaces, and in autoimmune processes [32–34]. The complex immune network involving distinct immunocompetent cells, including the T_H1 and T_H2 lymphocytes, is essentially pleiotropic and the interactions between the innate and the acquired functions ensure the multidirectional protection of a natural population to infectious agents and chronic-degenerative diseases. Thus, the controls of the variety of responses are multi-factorial and include the genetic constitution of the population and the distinct environmental aspects including the antigen nature and dose.

Among the environmental factors it must be included the adjuvants, a relevant statement usually neglected. These compounds exert a strong influence on the type of immune response and many adjuvants, including complete Freund's adjuvant, saponin-containing adjuvants and immune-stimulating complexes induce either a mixed or a T_H1-partial response, whereas, aluminum salts selectively stimulate a T_H2 immune response [32,35]. Here, the results proved that the ordered nanostructured SBA-15 induced co-production of IgG2a and IgG1 isotypes in mice (Fig. 4A and B).

Finally, contrasting with other studies, the adjuvant effectiveness of the non-toxic SBA-15 nanoparticles was ascertained in distinct mouse lines, not only the common worldwide employed isogenic lines, each one representing a single individual. In this study, the use of the outbred genetically selected H and L mice, mainly the low responder individuals, establish a new perspective since it proved possibly the improvement of immuneresponsiveness to vaccines in a natural population.

Acknowledgments

This work was supported by funds from the INCTTOX Program of Conselho Nacional de Pesquisa, Brazil [CNPq] and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo, Brazil [FAPESP] and Cristália Pharmaceutics. D. V. Tambourgi, M.C.A. Fantini and O.A. Sant'Anna are Researchers of CNPq-Brazil.

References

[1] Degen WG, Jansen T, Schijns VE. Vaccine adjuvant technology: from mechanistic concepts to practical applications. Expert Rev Vaccines 2003;2(2):327–35.
[2] Edelman R. The development and use of vaccine adjuvants. Mol Biotechnol 2002;21(2):129–48.
[3] McCluskie MJ, Weeratna RD. Novel adjuvant systems. Curr Drug Targets Infect Disord 2001;1(3):263–71.
[4] Bueno Da Costa MH, Quintilio W, Taniz aki MM, Sant'Anna OA, Schwendener RA, de Araujo PS. Heat shock protein micro-encapsulation as a double tool for the improvement of new generation vaccines. J Liposome Res 2002;12(1–2):29–35.
[5] Waite DC, Jacobson EW, Ennis FA, Edelman R, White B, Kammer R, et al. Three double-blind, randomized trials evaluating the safety and tolerance of different formulations of the saponin adjuvant QS-21. Vaccine 2001;19(28–29):3957–67.
[6] Marchand M, Punt CJ, Aamdal S, Escudier B, Kruit WH, Keilholz U, et al. Immunisation of metastatic cancer patients with MAGE-3 protein combined with adjuvant SBAS-2: a clinical report. Eur J Cancer 2003;39(1):70–7.
[7] Ulmer JB, Valley U, Rappuoli R. Vaccine manufacturing: challenges and solutions. Nat Biotechnol 2006;24(11):1377–83.
[8] Glenny AT, Buttle GAH, Steven MF. Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea-pigs: toxoid precipitated with alum. J Pathol 1931;34(1):267–75.
[9] Zhao D, Feng J, Huo Q, Melosh N, Fredrickson GH, Chmelka BF, et al. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. Science 1998;279(5350):548–52.
[10] Zhao D, Hou Q, Feng J, Chmelka BF, Stucky GD. Nanionic triblock and star diblock copolymer and surfactant syntheses of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. J Am Chem Soc 1998;120(24):6024–36.
[11] Matos JR, Mercuri LP, Kruk M, Jaroniec M. Toward the synthesis of extra-large-pore MCM-41 analogues. Chem Mater 2001;13(5):1726–31.
[12] Mercuri LP, Carvalho LV, Lima FA, Quayle C, Fantini MC, Tanaka GS, et al. Ordered mesoporous silica SBA-15: a new effective adjuvant to induce antibody response. Small 2006;2(2):254–6.
[13] Cabrera WH, Ibanez OM, Oliveira SL, Sant'Anna OA, Siqueira M, Mouton D, et al. Evidence for distinct polygenic regulation of antibody responses to some unrelated antigens in lines of mice selected for high or low antibody responses to somatic antigen of Salmonella. Immunogenetics 1982;16(6):583–92.
[14] Ferreira V, Gennari M, Reis MH, Siqueira M, Stiffel C, Mouton D, et al. Potentialities of immunocompetent cells in high and low antibody-producing lines of mice obtained by selective breedings for responsiveness to flagellar or somatic antigens of Salmonellae. J Immunogenet 1985;12(6):309–19.
[15] Sant'Anna OA, Ferreira VC, Reis MH, Gennari M, Ibanez OM, Esteves MB, et al. Genetic parameters of the polygenic regulation of antibody responsiveness to flagellar and somatic antigens of salmonellae. J Immunogenet 1982;9(3):191–205.
[16] Biozzi G, Mouton D, Stiffel C, Bouthillier Y. A major role of the macrophage in quantitative genetic regulation of immunoresponsiveness and antiinfectious immunity. Adv Immunol 1984;36(1):189–234.

[17] Biozzi G, Mouton D, Sant'Anna OA, Passos HC, Gennari M, Reis MH, et al. Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in the mouse. Curr Top Microbiol Immunol 1979;85(1):67–98.
[18] Gennari M, Bouthillier Y, Ibanez OM, Ferreira VC, Mevel JC, Reis MH, et al. Effect of silica on the genetic regulation of antibody responsiveness. Ann Inst Pasteur Immunol 1987;138(3):359–70.
[19] Zimmerman BT, Canono BP, Campbell PA. Silica decreases phagocytosis and bactericidal activity of both macrophages and neutrophils in vitro. Immunology 1986;59(4):521–5.
[20] Fantini MCA, Matos JR, Silva LCC, Mercuri LP, Chieri GO, Celer EB, et al. Ordered mesoporous silica: microwave synthesis. Mater Sci Eng B 2004;112(2–3):106–10.
[21] Giles AR. Guidelines for the use of animals in biomedical research. Thromb Haemost 1987;58(4):1078–84.
[22] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry 1971;8(9):871–4.
[23] Song SW, Hidajat K, Kawi S. Functionalized SBA-15 materials as carriers for controlled drug delivery: influence of surface properties on matrix-drug interactions. Langmuir 2005;21(21):9568–75.
[24] Eyles JE, Carpenter ZC, Alpar HO, Williamson ED. Immunological aspects of polymer microsphere vaccine delivery systems. J Drug Target 2003;11(8–10):509–14.
[25] Ludewig B, Barchiesi F, Pericin M, Zinkernagel RM, Hengartner H, Schwendener RA. In vivo antigen loading and activation of dendritic cells via a liposomal peptide vaccine mediates protective antiviral and anti-tumour immunity. Vaccine 2000;19(1):23–32.
[26] Zinkernagel RM, Ehl S, Aichele P, Oehen S, Kundig T, Hengartner H. Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. Immunol Rev 1997;156(1):199–209.
[27] Coombes AG, Major D, Wood JM, Hockley DJ, Minor PD, Davis SS. Resorbable lamellar particles of polylactide as adjuvants for influenza virus vaccines. Biomaterials 1998;19(11–12):1073–81.
[28] Chang M, Shi Y, Nail SL, HogenEsch H, Adams SB, White JL, et al. Degree of antigen adsorption in the vaccine or interstitial fluid and its effect on the antibody response in rabbits. Vaccine 2001;19(20–22):2884–9.
[29] Huaux F. New developments in the understanding of immunology in silicosis. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2007;7(2):168–73.
[30] Muruve DA, Petrilli V, Zaiss AK, White LR, Clark SA, Ross PJ, et al. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. Nature 2008;452(7183):103–7.
[31] Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. Nat Immunol 2008;9(8):847–56.
[32] Bomford R, Stapleton M, Winsor S, McKnight A, Andronova T. The control of the antibody isotype response to recombinant human immunodeficiency virus gp120 antigen by adjuvants. AIDS Res Hum Retroviruses 1992;8(10):1765–71.
[33] Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol Today 1996;17(3):138–46.
[34] O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. Immunity 1998;8(3):275–83.
[35] Comoy EE, Capron A, Thyphronitis G. In vivo induction of type 1 and 2 immune responses against protein antigens. Int Immunol 1997;9(4):523–31.

APÊNDICE C – Artigo:

SCARAMUZZI, K.; OLIVEIRA, D.C.A.; CARVALHO, L.V.; TAMBOURGI, D.V.; TENÓRIO, E.C.N.; RIZZI, M.; MUSSALEM, J.; FANTINI, M.C.A.; BOTOSSO, V.F.; SANT'ANNA, A.O. Nanostructured SBA-15 silica as an adjuvante in immunizations with hepatites B vaccine. **Einstein**, v. 9, p. 436-441, 2011.

ORIGINAL ARTICLE

Nanostructured SBA-15 silica as an adjuvant in immunizations with hepatitis B vaccine

Utilização da sílica nanoestruturada SBA-15 como adjuvante em imunizações com a vacina para hepatite B

Karina Scaramuzzi[1], Denise Cristina André Oliveira[2], Luciana Vieira Carvalho[1], Denise Vilarinho Tambourgi[1], Elisabeth Christina Nunes Tenório[2], Marisa Rizzi[3], Juliana Mussalem[3], Márcia Carvalho de Abreu Fantini[4], Viviane Fongaro Botosso[2], Osvaldo Augusto Sant´Anna[1]

ABSTRACT

Objective: To evaluate the applicability of SBA-15 silica as an adjuvant in immunizations with purified particles of the viral protein HBsAg, the main component of hepatitis B vaccine, Butang®, produced by Instituto Butantan. **Methods:** BALB/c mice orally or subcutaneously received 0.5 μg of HBsAg adsorbed/encapsulated to SBA-15 or adsorbed to $Al(OH)_3$. To assess the secondary immune response, a subcutaneous booster was administered 30 days after the first immunization. Individual serum and fecal samples of each group were periodically collected for specific antibody titration by ELISA. **Results:** Analysis of secretory IgA showed that mice orally primed with HBsAg on SBA-15 had increased levels of specific antibodies in primary and secondary immune responses. Specific serum IgA and IgG titers in HBsAg:SBA-15-orally immunized mice reached higher levels after the booster, demonstrating the effectiveness of oral vaccination with the use of silica. All immunized groups showed higher IgG1 levels. **Conclusion:** Our results clearly indicate the promising use of SBA-15 as an adjuvant, especially in oral immunizations.

Keywords: Hepatitis B; Oral vaccination; Adjuvants; Immunological memory

RESUMO

Objetivo: Demonstrar a aplicabilidade da sílica do tipo SBA-15 como adjuvante nas imunizações com a proteína recombinante HBsAg do vírus da hepatite B, principal componente da vacina Butang® produzida pelo Instituto Butantan. **Métodos:** Camundongos BALB/c receberam, pela via oral ou subcutânea, 0,5 μg do HbsAg adsorvido/encapsulado à SBA-15 ou adsorvido ao $Al(OH)_3$. Para avaliar a resposta imune secundária, uma dose de reforço foi administrada subcutaneamente 30 dias após a primeira imunização. Amostras individuais de soro e fezes foram coletadas periodicamente para titulação de anticorpos específicos por ELISA. **Resultados:** A análise de IgA secretada mostrou que camundongos imunizados pela via oral com HbsAg em SBA-15 apresentaram aumento nos níveis de anticorpos específicos nas respostas primária e secundária. Ainda, após o reforço, observaram-se maiores níveis de IgA e IgG séricas anti-HBsAg no grupo preparado com HBsAg:SBA-15 pela via oral. Todos os grupos imunizados apresentaram maior produção de IgG1. **Conclusão:** Os resultados indicam o usopromissor da sílica SBA-15 como adjuvante, especialmente nas imunizações pela via oral.

Descritores: Hepatite B; Vacinação oral; Adjuvantes; Memória imunológica

INTRODUCTION

Despite the availability of efficient prophylactic vaccines, human hepatitis-B virus (HBV) infection and its associated diseases still are a major public health problem. The World Health Organization (WHO) estimates that around 2 billion people worldwide show evidence of a former or current infection with HBV, and more than 350 million people are chronically HBV-infected. It is estimated that 1 to 1.5 million deaths per year occur due to HBV-related liver diseases, like cirrhosis and hepatic cancer[1-5].

Study carried out at the Immunochemistry Laboratory of Instituto Butantan – São Paulo (SP), Brazil.

[1] Immunochemistry Laboratory, Instituto Butantan, São Paulo (SP), Brazil.

[2] Hepatitis Division, Instituto Butantan – São Paulo (SP), Brazil.

[3] Farmacêutica Cristália, São Paulo (SP), Brazil.

[4] Department of Applied Physics, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo (SP), Brazil.

Corresponding author: Osvaldo Augusto Sant´Anna – Immunochemistry Laboratory, Butantan Institute – São Paulo (SP), Brazil – Tel.: 11 3726-7222 – extension: 2001 – Email: gbrazil@usp.br

*This paper is under the scope of the International Patent WO 07030901

Received on: Jun 27, 2011 – Accepted on: Oct 25, 2011

Conflict of interest: none

HBV is a small enveloped DNA virus that belongs to the *Hepadnaviridae* family. The infectious particle contains an icosahedral nucleocapsid encompassing a circular DNA enclosed by a lipid bilayer envelope in which the proteins large (L), middle (M) and small (S) are inserted. In addition to the contagious virus particles, cells infected by HBV produce large quantities of noninfectious subviral particles of spherical or filamentous forms of 22 nm in diameter[6,7].

Prevention by vaccination is a unique and effective strategy to avoid disease. Several vaccine manufacturers have used recombinant DNA technology to express the S surface protein of HBV(HBsAg) in yeasts. In 1996, Butantan Institute initiated production of the recombinant vaccine for hepatitis B that also contains highly purified particles of the S recombinant protein adsorbed to aluminum hydroxide ($Al(OH)_3$). This vaccine, Butang®, has the same efficacy and safety as the imported vaccines and also employs genetic engineering techniques using *Hansenulla polymorpha* yeasts as biological vectors. This system enhanced protein expression four to ten times and strongly diminished the final costs of vaccine production[8].

Although considered efficient and harmless, the adjuvant in the Butang® preparation, $Al(OH)_3$ can lead to side effects like exacerbated local inflammation, granuloma, and even necrosis. Furthermore, alum predominantly elicits a T_H2 immune response polarization, which is less effective against viral infections[9,10].

Thus, there is a growing interest in investigating new immunization strategies and, especially, the development of adjuvants that do not interfere in the polarization of immune response, besides being secure, economically viable, chemically stable, and capable of positively modulating the immune response of poor responder individuals such as the elderly and the immunosuppressed[9,10].

Since the natural route of most infections is through the mucosa, and mucosal immunization is the most effective means of mimicking the induction of natural protection, it is important to highlight all the benefits of needle-free immunizations. Oral vaccines are easily administered and the side effects are minimal. Unfortunately, due to the harsh gastric environment, the development of local and systemic immunological response is impaired[11-16].

SBA-15 particles have a highly organized structure and, due to their physicochemical properties, they also have a great potential for application in different areas. These materials are able to interact with atoms, ions, and molecules, not only on the surface but also inside nanopores of approximately 10 nm in diameter[17-19]. This silica is synthesized in acidic medium and has a structure with remarkable thermal, hydrothermal, and mechanical stability (Figure 1). Recently, our group demonstrated the adjuvant potential of SBA-15 and currently several promising studies are underway at the Immunochemistry Laboratory of the Butantan Institute[20,21].

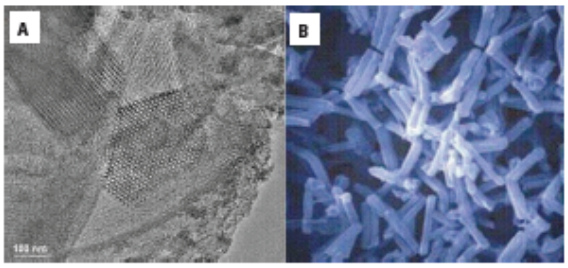


Figure 1. Mesoporous nanostructured SBA-15. (A) Transmission Electron Microscopy (TEM) of SBA-15 silica, highlighting its hexagonal ordered porous structure with mean pore diameter of around 10 nm. (B) Scanning Electron Microscopy (SEM) picture of SBA-15 particles of around 30 μm in diameter, showing their macroporous morphology

OBJECTIVE

To evaluate the applicability of SBA-15 silica as an adjuvant in immunizations with purified particles of the viral protein, HBsAg, the main component of the hepatitis B vaccine, Butang® produced by Butantan Institute.

METHODS

Animals

Female 8 to 12 week-old isogenic BALB/c mice, supplied by Butantan Institute, were maintained at the animal facilities of the Immunochemistry Laboratory, under ethical conditions according to the international rules of animal care by the International Animal Welfare Recommendations[22]. All animal experiments were approved by the Animal Use and Care Ethics Committees from the Institute of Biomedical Science of the *Universidade de São Paulo* and from the *Instituto Butantan*.

SBA-15 silica synthesis

SBA-15 samples were synthesized by using a poly-(ethylene oxide)-poly-(propylene oxide)-poly-(ethylene oxide) triblock copolymer (Pluronic P123, $EO_{20}PO_{70}EO_{20}$, M_{av} = 5800 - BASF Chemical Co., Mount Olive, NJ, USA) acting as a micellar template. The source of silica for polymerization was the tetraethyl orthosilicate (TEOS), acquired

from Fluka/Sigma Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA). Hydrochloric acid was purchased from Fisher Scientific Co. (Pittsburgh, PA, USA). The synthesis and adsorption characterization of samples were performed as described by Matos et al.[23].

Mice immunization

BALB/c mice (n = 5/group) received, by subcutaneous (s.c) injection or gavage, 0.5 μg of the HBsAg protein adsorbed or not to SBA-15 in a final volume of 0.25 mL PBS. HBsAg were mixed at a ratio of 1:10 antigen: SBA-15, v/v (0.5 μg and 5 μg, respectively). The mixtures were kept at rest at 4°C for 24 hours before immunizations. As controls, we evaluated specific antibody levels in non-immunized animals. Mice were also immunized s.c. with 0.5 μg of the HBsAg adsorbed to 6.25 μg $Al(OH)_3$ in a final volume of 0.25 mL for further comparative analysis. To assess the secondary immune response, all experimental groups received by the s.c. route a second dose of antigen adsorbed or not to SBA-15 or $Al(OH)_3$, 30 days after the first dose.

Individual blood samples from the retro-orbital venous plexus and fecal samples were periodically collected for specific antibody titer detection and posterior quantification by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Fecal pellet extract collection

Fresh fecal pellets from orally immunized BALB/c mice were collected and weighed. Five milliliters of an inhibitory solution (phenylmethylsulphonyl fluoride - PMSF) 1mM was added, BSA 1% in PBS per 1 g of fecal pellet. After 15 minutes, the material was vigorously vortexed and samples were centrifuged at 20,000 $\bar{x}$ g for 10 minutes. The supernatants were removed and stored at -80°C until the ELISA assay.

ELISA for anti-HBsAg antibodies

Microplates with high binding properties (Maxisorp Nunc International, Rochester, NY, USA) were coated with 1.5 μg/mL of HBsAg diluted in carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6 and incubated for 1 hour at 37°C and then moved to 4°C for 18 hours. Next, the plates were washed with PBS containing 0.05% Tween (PBS-T) and then blocked with 0.5% gelatin in PBS for 2 hours at 37°C. The washing procedure was repeated. Samples were distributed, serially diluted in PBS-T/gelatin 0.5%, and incubated for 1 hour at 37°C to quantify IgG and its isotypes and for 18 hours to serum and secreted IgA. Microplates were submitted to another washing procedure and 100 μL of anti-IgG (diluted 1: 2000), anti-IgG1 and anti-IgG2a (diluted 1: 1000), or anti-IgA (diluted 1: 500) labeled with peroxidase (Promega Co., Madison, WI, USA) were added. The plates were washed and incubated in the dark at room temperature with a buffer substrate (20 mg OPD diluted in 40 mL citrate-phosphate buffer pH 5.0; H_2O_2 at 0.3%).The reaction was stopped with 50 μL/well of citric acid 0.2 M and the absorbance was measured at 450 nm using the ELISA reader (Multiskan - Labsystems, Helsinki, Finland). Titers were calculated neglecting 20% of saturation dilution absorbance and expressed as $\log_2$.

Statistical analysis

Results were expressed as mean values ± standard deviation. Statistical significance was determined by the unpaired *t*-test and set at $p < 0.05$ using GraphPad Prism 4.0 software (La Jolla, CA, USA).

RESULTS

Anti-HBsAg specific antibody response

Subcutaneous immunization

For the evaluation of specific IgG and its isotypes, blood samples were periodically collected for antibody titration. After the first dose, 7, 14, and 30 days, no serum antibody levels were detected in any of the experimental groups. IgG levels, after the booster, measured 7, 14, and 30 days post-second dose were higher in both SBA-15 (5.2 $\log_2$, 7.8 $\log_2$and 9 $\log_2$) and $Al(OH)_3$ groups (11 $\log_2$,11 $\log_2$ and 9.6 $\log_2$). A significant difference was detected in IgG titers between those groups at day 7 post-booster ($p < 0.05$), showing a better humoral response after s.c. immunization with $Al(OH)_3$ (Figure 2A). Therefore, it is patent that both adjuvants led to seroconversion.

Specific IgG subclasses responses were evaluated in both s.c. immunized groups after the second dose at days 7, 14, and 30 post-immunizations. Anti-HBsAg IgG1 titers were similarly high in both HBsAg:$Al(OH)_3$ (10.2 $\log_2$, 12.5 $\log_2$ and 12 $\log_2$) and HBsAg:SBA-15 groups (7.4 $\log_2$, 10.4 $\log_2$ and 9 $\log_2$) (Figure 2B). However, at day 7 post-immunization, a significant difference was observed between the groups ($p < 0.05$), clearly indicating that animals that received the formulation with $Al(OH)_3$ presented with higher levels of IgG1 (Figure 2B).

Specific IgG2a titers, detected 7, 14, and 30 days post-booster, were 8 $\log_2$, 8.5 $\log_2$ and 7.8 $\log_2$, respectively,in the $Al(OH)_3$ group and 5.8 $\log_2$, 6.6 $\log_2$, 6.8 $\log_2$ in the silica group (Figure 2C).

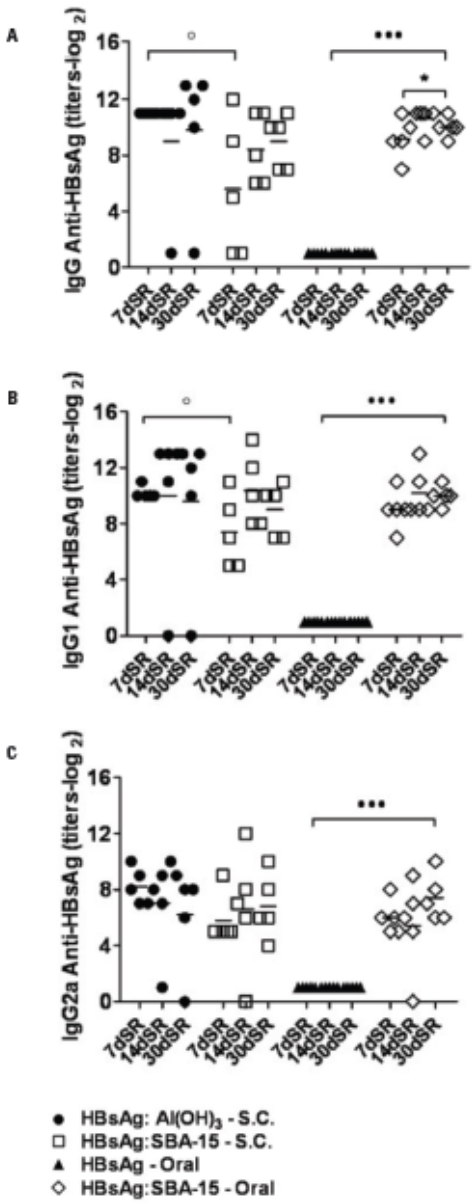


Figure 2. Antibody production by orally or subcutaneously immunized BALB/c mice. (A) Serum IgG, (B) IgG1, (C) IgG2a anti-HBsAg levels (n = 5 animals/group). Antibody titers measured by ELISA 7, 14 and 30 days after booster, administrated subcutaneously 30 days after first immunization. Group of animals immunized with rHBsAg was used as reference for the unpaired Student *t* test analysis, *$p < 0.05$; •••$p < 0.001$. Antibodies titers at days 7, 14 and 30 after booster were also used as reference for the unpaired Student *t* test analysis, °$p < 0.05$

Animals immunized with $Al(OH)_3$ showed higher titers of anti-HBsAg IgG1 in comparison to IgG2a, with statistical difference ($p < 0.05$), demonstrating a slightly predominance of a T_H2 response (Figure 3).

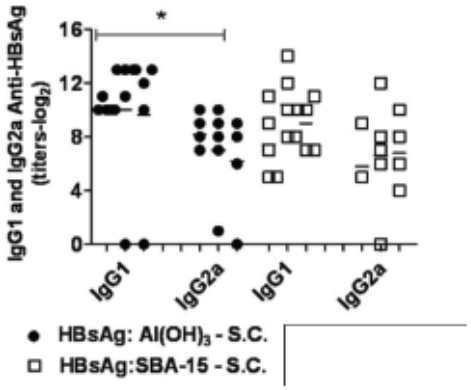


Figure 3. IgG1 and IgG2a antibody production by subcutaneously immunized BALB/c mice. Serum IgG1 and IgG2a anti-HBsAg antibody levels (n = 5 animals/group). Antibody titers measured by ELISA 7, 14 and 30 days after booster, administrated subcutaneously 30 days after first immunization. IgG1 and IgG2a responses between the groups were used as reference for the unpaired Student *t* test analysis, *$p < 0.05$

Oral immunization

To determine the use of SBA-15 as an oral adjuvant, BALB/c mice were immunized with HBsAg in PBS or HBsAg adsorbed to silica. After the first administration, no specific serum antibodies titers (IgG, IgG1, IgG2a and IgA) were detected in either group.

The sera collected 7, 14, and 30 days after second s.c. immunization were evaluated for specific IgG and its isotype responses. Mice immunized only with HBsAg did not show seroconversion (Figure 2A).

On the other hand, IgG response in the group HBsAg:SBA-15 was higher: 9.2 $\log_2$,10.6 $\log_2$ and10 $\log_2$ at days 7, 14, and 30 after booster, showing a statistical difference 14 days after thesecond dose, compared to the first 7 days ($p < 0.001$) (Figure 2A). Anti-HBsAg IgG1 titers were 9 $\log_2$,10.2 $\log_2$,10$\log_2$; while IgG2a titers were 6 $\log_2$, 6.2 $\log_2$, 7.4 $\log_2$ (Figure 4) in those animals immunized with silica. Mice immunized without SBA-15 did not respond. After the first oral immunization with HBsAg:SBA-15, there was apredominance of a T_H2 response, with higher production of IgG1 (9.7 $\log_2$) instead of IgG2a (6.4 $\log_2$) ($p < 0.005$) (Figure 4).

Specific serum IgA titers were only detected in the group HBsAg:SBA-15, 10 days after the s.c. booster (4.5 $\log_2$) (Figure 5A).

Analysis of secretory IgA (s-IgA) showed that antibody titers of the group orally immunized with HBsAg:SBA-15 were higher than the s-IgA levels of the group immunized without silica. Ten days after the first immunization, s-IgA titers were 3 $\log_2$ in HBsAg:SBA-15 group and remained stable after the s.c. booster (Figure 5B).

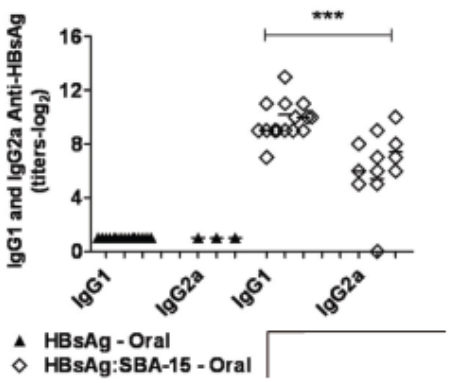


Figure 4. IgG1 and IgG2a antibody production by orally immunized BALB/c mice. Serum IgG1 and IgG2a anti-HBsAg antibody levels (n = 5 animals/group). Antibody titers measured by ELISA 7, 14 and 30 days after booster, administrated subcutaneously 30 days after first immunization. IgG1 and IgG2a response between the groups were used as reference for the unpaired Student *t* test analysis, *** $p < 0.05$

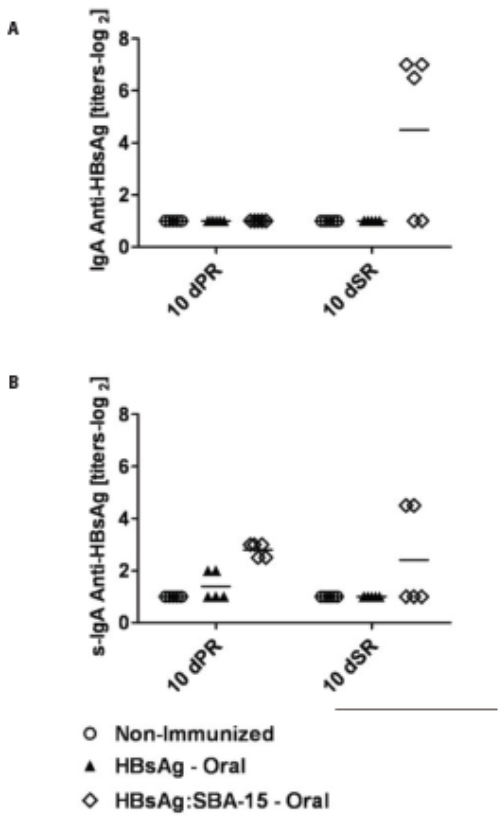


Figure 5. Antibody production by orally or subcutaneously immunized BALB/c mice. (A) Secretory IgA (s-IgA) and (B) serum IgA anti-HBsAg levels (n = 5 animals/group). Antibody titers measured by ELISA during primary and secondary immune responses. Subcutaneous booster was administrated 30 days after first oral immunization. Groups of animals non-immunized and immunized with rHBsAg were used as reference for the unpaired Student *t* test analysis

DISCUSSION

The immune system is a complex network that involves activation, regulation, and suppression, resultant characteristics of interactions involving cells and molecules. This essentially pleiotropic network is controlled by gene polymorphism of high adaptive values of traits (MHC, Complement System, genes that regulate the expressions of variable regions of immunoglobulin), and the main immunobiological functions (antibody production, inflammatory reactivity, tolerance) are submitted to polygenic controls that are, at least partially, independent.

The influence of environmental factors in the expansion of infectious diseases, such as the introduction of new antibiotics and vaccines that exert selective pressure on a given pathogen, changes the resistance rates of a microorganism. There are other environmental factors that act on both the capacity and the intensity of immuneresponsiveness to a given immunogen, modulating the genetically determined traits. This is the case of the adjuvants, either artificial or natural.

That is why it is so important to establish efficient vaccination schedules, with a proper planning of doses of antigens and suitable gaps between immunizations[24].

Besides the efficiency of all commercially available vaccines against Hepatitis B, it is always important to consider alternatives to decrease the boosters and the costs per dose. Moreover, the possibility of developing orally administered vaccines is of great importance. Needle-free immunizations have a wide range of advantages compared to other routes of administration. However, there are limitations for the success of an oral vaccine. Protein antigens usually fail in generating detectable systemic and local immune responses due to the hash gastric environment[15].

Recent results obtained from oral immunizations with Hepatitis A vaccines and human gamma globulin (HGG) adsorbed to SBA-15 have shown the applicability of SBA-15 as a support for antigens, protecting the epitopes from degradation and allowing the development of an efficient and specific immune response[25].

Comparing the formulation that uses $Al(OH)_3$ as adjuvant to its recombinant protein HBsAg adsorbed to SBA-15, it was clear that, after s.c. immunizations, a strong antibody response against HBsAg was obtained. Nevertheless, when we first administered orally a dose with the recombinant protein on silica, it was clear that the immune system was primed leading to an equal humoral response compared to the parenteral immunization (Figure 2). It is known that higher doses of antigens or the repetition of the vaccination did not essentially result in protection. Consequently, this is a significant result when we think about combining

oral and parenteral administration. Perhaps it will be possible to diminish the number of vaccine doses, since antibody production was detected after a second booster shot, and not only after a third dose as usual. Moreover, it will be possible to introduce oral immunizations on the vaccine schedule.

Another relevant fact is that, after the first oral immunization, good local antibody production (s-IgA) was identified, proving its efficacy and strengthening our plans to study the use of this silica in oral vaccines (Figures 4 and 5). After oral priming, it is possible that specific immune cells were activated, leading to the successful development of immunological memory.

As is already known, HBsAg tends to induce a T_H2 immune response with a major production of IgG1. This T_H2 pattern may be due to the subcutaneous administration and the presence of $Al(OH)_3$ in the vaccine formulation[26].

CONCLUSION

Our results corroborate the idea of the promising use of SBA-15 silica as an adjuvant/vehicle, even for oral immunizations. Compared to the HBV vaccines currently used, SBA-15 could anticipate and enhance the humoral response after oral and subcutaneous immunizations with a slightly predominance of a T_H2 type immune response. In oral immunizations, it is believed that these particles act in the physical protection of antigens or immunodominant epitopes, helping in their slow release and efficient activation of the immune system, and in the competent induction of immunological memory.

FINANCIAL SUPPORT

This work was supported by funds from the INCTTOX Program of the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Cristália Pharmaceutics,* and *Fundação Butantan – Brazil.*

REFERENCES

1. Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. World J Gastroenterol. 2007;13(1):65-73.
2. Makidon PE, Bielinska AU, Nigavekar SS, Janczak KW, Knowlton J, Scott AJ, et al. Pre-clinical evaluation of a novel nanoemulsion-based hepatitis B mucosal vaccine. PLoS One. 2008;3(8):e2954.
3. Schmeltzer P, Sherman KE. Occult hepatitis B: clinical implications and treatment decisions. Dig Dis Sci. 2010 ;55(12):3328-35.
4. Thoelen S, De Clercq N, Tornieporth N. A prophylactic hepatitis B vaccine with a novel adjuvant system.Vaccine. 2001;19(17-19):2400-3.
5. West DJ, Calandra GB. Vaccine induced immunologic memory for hepatitis B surface antigen: implications for policy on booster vaccination. Vaccine. 1996;14(11):1019-27.
6. Gerlich WH, Bremer C, Saniewski M, Schuttler CG, Wend UC, Willems WR, et al. Occult hepatitis B virus infection: detection and significance. Dig Dis. 2010;28(1):116-25.
7. Glebe D. Recent advances in hepatitis B virus research: a German point of view. World J Gastroenterol. 2007;13(1):8-13.
8. Ioshimoto LM, Rissato ML, Bonilha VS, Miyaki C, Raw II, Granovski N. Safety and immunogenicity of hepatitis B vaccine ButaNG in adults. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1999;41(3):191-3.
9. Brewer JM. (How) do aluminium adjuvants work? Immunol Lett. 2006; 102(1):10-5.
10. Cox JC, Coulter AR. Adjuvants--a classification and review of their modes of action. Vaccine. 1997;15(3):248-56.
11. Brandtzaeg P, Baekkevold ES, Farstad IN, JahnsenFL, Johansen FE, Nilsen EM, et al. Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? Immunol Today. 1999;20(3):141-51.
12. Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. Immunol Rev. 2005 Aug;206:232-59.
13. Jepson MA, Clark MA, Foster N, Mason CM, Bennett MK, Simmons NL, et al. Targeting to intestinal M cells. J Anat. 1996;189 (Pt 3):507-16.
14. Kraehenbuhl JP, Corbett M. Immunology. Keeping the gut microflora at bay. Science. 2004;303(5664):1624-5.
15. Shalaby WS. Development of oral vaccines to stimulate mucosal and systemic immunity: barriers and novel strategies. Clin Immunol Immunopathol. 1995;74(2):127-34.
16. Yeh P, Ellens H, Smith PL. Physiological considerations in the design of particulate dosage forms for oral vaccine delivery. Adv Drug Deliv Rev. 1998;34(2-3):123-33.
17. Kresge CT, Leonowiez ME, Roth WJ, Vartuli JC, Beck JS. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. Nature. 1992;359(1):710-2.
18. Yang H, Coombs N, Ozin GA. Morphogenesis of shapes and surface patterns in mesoporous silica. Nature. 1997;386(1):692-5.
19. Zhao D, Feng J, Huo Q, Melosh N, Fredrickson GH, Chmelka BF, et al. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. Science. 1998;279(5350):548-52.
20. Carvalho LV, Ruiz R de C, Scaramuzzi K, Marengo EB, Matos JR, Tambourgi DV, et al. Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15. Vaccine. 2010;28(50):7829-36.
21. Mercuri LP, Carvalho LV, Lima FA, Quayle C, Fantini MC, Tanaka GS, et al. Ordered mesoporous silica SBA-15: a new effective adjuvant to induce antibody response.Small. 2006;2(2):254-6.
22. Giles AR. Guidelines for the use of animals in biomedical research. Thromb Haemost. 1987;58(4):1078-84.
23. Matos JR, Mercuri LP, Kruk M, Jaroniec M. Toward the synthesis of extra-large-pore MCM-41 analogues. Chem Mater. 2001;13(1):1726-31.
24. Scaramuzzi K, Pagani E, Scivoleto R, Fantini MCdA, Sant´Anna OA. Uma história contada no futuro: complexo imunogênico constituído por antígenos vacinais adsorvidos/encapsulados em sílica mesoporosa nanoestruturada. Cadernos de História da Ciência. 2010;5(1):57-66.
25. Scaramuzzi K. Aplicação da sílica nanoestruturada SBA-15 nas imunizações pela via oral [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.
26. Lobaina Y, Trujillo H, Garcia D, Gambe A, Chacon Y, Blanco A, et al. The effect of the parenteral route of administration on the immune response to simultaneous nasal and parenteral immunizations using a new HBV therapeutic vaccine candidate. Viral Immunol. 2010;23(5):521-9.

APÊNDICE D – Artigo:

VASCONCELLOS, H.L.; SCARAMUZZI, K.; NASCIMENTO, I.P.; Da COSTA FERREIRA, J.M.Jr.; ABE, C.M.; PIAZZA, R.M.; KIPNIS, A.; DIAS DA SILVA, W. Generation of recombinant bacillus Calmette-Guérin and *Mycobacterium smegmatis* expressing BfpA and intimin as vaccine vectors against enteropathogenic *Escherichia coli*. **Vaccine**, v. 41, p. 5999-6005, 2012.

Vaccine 30 (2012) 5999–6005

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Vaccine

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

Generation of recombinant bacillus Calmette–Guérin and *Mycobacterium smegmatis* expressing BfpA and intimin as vaccine vectors against enteropathogenic *Escherichia coli*

Halyka Luzorio Franzotti Vasconcellos[a], Karina Scaramuzzi[a], Ivan Pereira Nascimento[b], Jorge M. Da Costa Ferreira Jr.[a], Cecilia M. Abe[d], Roxane M.F. Piazza[c], Andre Kipnis[e], Wilmar Dias da Silva[a,*]

[a] Laboratory of Immunochemistry, Butantan Institute, São Paulo, Brazil
[b] Laboratory of Biotechnology IV, Butantan Institute, São Paulo, Brazil
[c] Laboratory of Bacteriology, Butantan Institute, São Paulo, Brazil
[d] Laboratory of Cell Biology, Butantan Institute, São Paulo, Brazil
[e] Department of Microbiology, Immunology, Parasitology, and Pathology, Tropical Disease and Public Health Institute, University of Goiás, Goiânia, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 April 2012
Received in revised form 11 May 2012
Accepted 30 May 2012
Available online 21 July 2012

Keywords:
Diarrhea
EPEC
BCG
M. smegmatis
Recombinant vaccine
bfpA and *intimin*

ABSTRACT

Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) is an important cause of diarrhea in children. EPEC adheres to the intestinal epithelium and causes attaching and effacing (A/E) lesions. Recombinant *Mycobacterium smegmatis* (Smeg) and *Mycobacterium bovis* BCG strains were constructed to express either BfpA or intimin. The entire bfpA gene and a portion of the intimin gene were amplified by PCR from EPEC genomic DNA and inserted into the pMIP12 vector at the *BamHI/KpnI* sites. The pMIP_bfpA and pMIP_intimin vectors were introduced separately into Smeg and BCG. Recombinant clones were selected based on kanamycin resistance and designated rSmeg_pMIP_(bfpA or intimin) and rBCG_pMIP_(bfpA or intimin). The expression of bfpA and intimin was detected by Immunoblotting using polyclonal anti-BfpA and anti-intimin antibodies. The immunogenicity of these proteins was assessed in C57BL/6 mice by assaying the feces and serum for the presence of anti-BfpA and anti-intimin IgA and IgG antibodies. TNF-α and INF-γ were produced in vitro by spleen cells from mice immunized with recombinant BfpA, whereas TNF-γ was produced in mice immunized with recombinant intimin. The adhesion of EPEC (E2348/69) to HEp-2 target cells was blocked by IgA or IgG antibodies from mice immunized with recombinant BfpA or intimin but not by antibodies from non-immunized mice. Immunogenic non-infectious vectors containing relevant EPEC virulence genes may be promising vaccine candidates.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Diarrhea remains one of the top causes of death in low- and middle-income countries, in children under 5 years of age. A wide range can be responsible for this illness. *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) strains are among the main bacterial causes of this disease [1,2]. EPEC adheres to the host cells and induces attaching and effacing (A/E) lesions, culminating with induction of diarrhea [3]. The formation of A/E lesions involves a type III secretion system encoded on pathogenicity island locus of enterocyte effacement (LEE), which is responsible for delivering several pathogenic factors into host cells [4].

Intimin is a 94–97 kDa protein expressed on the EPEC surface that mediates adhesion of EPEC to the epithelial gut cells [4] that mediates intimate contact with the bacterial translocated intimin receptor (Tir) [5]. The N-terminal region is conserved among the different intimin subtypes, while the C-terminal regions are highly variable. The 29 intimin subtypes are identified according to their C-terminal amino acid sequences [6–8]. Intimin-β is the most common subtype expressed in EPEC isolates [9–11].

Bundle-forming pilus (BfpA) is another virulence factor, which mediates the initial contact between EPEC and the host cell [12]. BfpA is encoded by a gene localized on a plasmid 50–70 MDa in size and is designated as EPEC adherence factor (EAF) [3,13–15]. Within adherent micro-colonies of EPEC, BfpA organizes a meshwork that allows bacteria to attach to each other and to tether themselves to the host cell surface [3]. Therefore, BfpA and intimin are two important virulence factors and are considered to be strategic target candidates for the design of a new vaccine against EPEC.

* Corresponding author at: Av. Vital Brazil, 1500, Sao Paulo, SP 05503-900, Brazil. Tel.: +55 11 3726 7222x2001; fax: +55 11 3726 1505.
E-mail address: wds@butantan.gov.br (W. Dias da Silva).

0264-410X/$ – see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.05.083

The generation of stable vectors expressing the desired immunogens is the goal of modern vaccine technology. The inclusion of genes encoding relevant epitopes into living, non-infective vectors that constitutively express immunological adjuvant components would be ideal. Attenuated bacteria have been used as vectors to express and deliver heterologous antigens. This type of vaccine vector is an attractive system because it can elicit mucosal, humoral and cellular host immune responses to foreign antigens [16]. These live vectors have been used extensively to express antigens of different types of pathogens, including viruses, bacteria and parasites, some of which have demonstrated positive results [17]. However, each vector has its unique features that should be considered before it is used. In this study, the genes encoding BfpA and intimin were investigated using two different live vectors: *Mycobacterium bovis* BCG Moreau (BCG) and *Mycobacterium smegmatis* mc^2155 (Smeg) to generate the recombinant strains.

2. Materials and methods

2.1. Animals

C57BL/6 female mice, 4 weeks old, 18–22 g were supplied by Isogenic Mouse Breeding Facility of the Butantan Institute. All animals were cared under ethical conditions according to the Brazilian code for the use of laboratory animals [18]. All protocols were approved by the Animal Care and Ethics Committees at the Butantan Institute, São Paulo, Brazil.

2.2. Bacterial strains and growth conditions

All cloning steps were performed in DH5-α *E. coli* strain grown in Luria–Bertani broth (LB) supplemented with kanamycin (20 μg/mL) or ampicillin (100 μg/mL). Liquid cultures of BCG and Smeg were grown in Middlebrook 7H9 media (MB7H9; Difco, MI, USA) supplemented with oleic-albumin-dextrose-catalase (OADC) (MB7H9/OADC) with or without 20 μg/mL kanamycin with gentle shaking at 37 °C. Eletrocompetent BCG and Smeg cells were prepared and transformed by electroporation as previously described [19]. Transformed cultures were plated onto Middlebrook 7H10 agar plates supplemented with OADC (MB7H10/OADC) containing 20 μg/mL kanamycin. The plates were incubated at 37 °C for 3 weeks, and the transformants were expanded in liquid MB7H9/OADC media containing appropriate antibiotics.

2.3. Plasmid construction

The *bfpA* and *intimin* (*eae*) genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The EPEC E2348/69 prototype genomic DNA was used as a template, and the constructed oligonucleotide primers were as follows: *bfpA* forward primer (FP) 5′-TAG GGA TCC CTG TCT TTG ATT GAA TCT GCA ATG GTG CTT-3′ and reverse primer (RP) 5′-TAG GGT ACC TTA CTT CAT AAA ATA TGT AAC TTT ATT GGT-3′; *intimin* FP 5′-TAG GGA TCC GGG ATC GAT TAC C-3′ and RP 5′-TAG GGT ACC TTT ATC AGC CTT AAT CTC A-3′. The underlined regions indicate *KpnI* and *BamHI* sites. Briefly, the amplified BfpA and *intimin* (eae) PCR products were purified and sub-cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, USA). Both genes were digested with *BamHI* and *KpnI* and sub-cloned into the mycobacterial vector pMIP12 (kindly provided by Brigitte Gicquel, Pasteur Institute, France). The resulting plasmids were identified as *pMH12-bfpA* and *pMH12-intimin*. The plasmids were validated by successive analyses with restriction endonucleases and DNA sequencing using the primer 5′-TTC AAA CTA TCG CCG GCT GA-3′.

2.4. Detection of BfpA and intimin in recombinant BCG and Smeg by immunoblotting

Whole-cell protein extracts of the recombinant BCG and Smeg strains were resolved by SDS-PAGE (15%) and subsequently transferred onto a nitrocellulose membrane. After the transfer, nitrocellulose sheets were probed with mouse anti-BfpA or anti-intimin polyclonal sera followed by anti-mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase as the secondary antibody. Purified BfpA (19.5 kDa) and intimin (34 kDa) were used as positive controls. The membranes were developed with a chemiluminescent kit (MilliPore, USA) and were exposed on an Image Quant LAS 4000 (GE, USA).

2.5. Mice immunization

Recombinant bacterial strains and their respective controls (empty BCG or Smeg) were grown for 2 weeks until the late stationary phase ($O.D._{600\,nm} = 1.0$), collected by centrifugation (2000 × *g* at 4 °C for 10 min), washed twice and resuspended in PBS. Mice were immunized on days 0, 15, 30 and 45 with 10^8 CFU in 200 μL PBS by oral gavage or by intraperitoneal injection. Control groups received 200 μL PBS or empty BCG and Smeg. Pre-immune sera and feces were collected and analyzed for the presence of anti-BfpA and anti-intimin antibodies prior to immunization.

2.6. Adjuvants

Recombinant BCG or Smeg expressing BfpA or intimin were mixed with nanostructured silica adjuvant (SBA-15) according to a previously described method [20]. SBA-15 silica was kindly provided by Osvaldo Augusto SantiAnna, Butantan Institute, Brazil.

2.7. Measurement of antibodies by ELISA

Fifteen days after the final immunization, blood and feces were collected. Blood was collected by retro-orbital bleeding and incubated overnight at 4 °C before centrifuged at 1000 × *g* for 10 min at room temperature and sera was transferred to new tubes and stored at −20 °C. Feces were collected, weighed and re-suspended in PBS containing 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) (Boehringer Mannheim Co., USA) and 1% Bovine Serum Albumin (BSA) (Fisher Scientific Co., USA) at a ratio of 1 g feces per 5 mL inhibitory solution. After 15 min on ice, the samples were shaken and then centrifuged at 22,000 × *g* for 10 min, and the supernatants were stored at −80 °C until use. Total immunoglobulin G (IgG) and A (IgA) isotypes and the IgG1 or IgG2a antibody subclasses specific for BfpA and intimin were evaluated by ELISA. Briefly, microtiter plates were coated overnight at 4 °C with 5 μg/mL recombinant BfpA or intimin (purified in our laboratory) in 100 μL PBS. The plates were then blocked with 10% BSA in PBS for 1 h at room temperature. After each incubation, the plates were washed three times with PBS containing 0.05% Tween-20 (PBST). Aliquots of serum and fecal extracts were added to individual wells (100 μL), and the plates were incubated for 1 h at room temperature. After washing, the plates were incubated with 100 μL peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG or anti-mouse IgA or anti-mouse IgG1 and IgG2a (Southern Biotechnologies, USA) at a dilution of 1:1000 in the same diluent pursued by 1 h incubation at room temperature. The peroxidase activity was measured using the o-phenylenediamine (OPD) substrate and read at a wavelength of 450 nm.

2.8. Detection of cytokines in spleen cell cultures

Spleens were recovered from immunized mice (5 animals per group) 15 days after the final immunization. Cell suspensions were

prepared at a concentration of 5×10^6 cells/mL in RPMI medium (Gibco, USA) containing polymixin (1 μg/mL) and were plated in 24-well plates. Cells were left unstimulated or were stimulated for 48 h with extracts of Smeg, BCG, purified BfpA, purified intimin or ConA (Sigma, USA) at a concentration of 5 μg/mL at 37 °C in 5% CO_2. Cytokine secretion was evaluated using the Cytometric Bead Array Th1/Th2 Kit (CBA; BD Bioscience, USA) and samples were read on a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, USA). Each experiment was repeated three times.

2.9. Inhibition of EPEC adherence to Hep-2 cells

To evaluate the ability of the anti-recombinant BfpA and intimin antibodies to interfere with the adhesion of EPEC to host cells, a standard assay using HEp-2 target cells was used. Hep-2 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% SFB in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 at 37 °C. To evaluate the inhibitory action of the specific antibodies, serum or fecal samples were incubated at a ratio of 1:4 with 10^7 EPEC bacteria for 1 h at 37 °C before being added to the Hep-2 cultures. After the incorporation of the bacteria, the HEp-2 monolayers were kept at 37 °C for 3 h. The HEp-2 monolayers were washed with PBS, fixed with methanol and stained with Giemsa solution to visualize the adherent bacteria by light microscopy. The percentage of HEp-2 cells with bound bacteria was determined for each tested antibody.

2.10. Statistical analysis

Student's *t*-test was employed to determine the significance of differences between the studied groups. p values <0.05 (*) were considered to be significant.

3. Results

3.1. Expression of BfpA and intimin by BCG and Smeg

DNA fragments encoding *bfpA* (600 bp) and *intimin* ($eae_{388-667}$) (840 bp), were amplified by PCR from EPEC (E2348/69) and ligated into the *KpnI* and *BamHI* sites of the pMIP12 vector under the control of the pblaF* promoter (Supplementary Figure); the constructs were named pMH12-*bfpA* and pMH12-*intimin*, respectively. The plasmids were electroporated into BCG and Smeg, and the resulting strains were examined for BfpA and intimin expression. Expression of both *bfpA* and *intimin* (*eae*) was confirmed by immunoblotting bacterial whole-cell extracts using anti-BfpA or anti-intimin antisera. As observed in Fig. 1A and B, the antisera specifically recognized bands of approximately 19.5 and 34 kDa, corresponding to BfpA and intimin, respectively, from both rBCG and rSmeg strains. No proteins were recognized by the antisera in whole-cell lysates from BCG or Smeg controls without the plasmid vectors (Fig. 1A and B).

3.2. Induction of antibodies by immunizing mice with recombinant BCG and Smeg

C57BL/6 mice were immunized by oral gavage or intraperitoneal injection with 4 doses of 1×10^8 CFU in 200 μL of rBCG-*bfpA*, rSmeg-*bfpA*, rBCG-*intimin* or rSmeg-*intimin* at two-week intervals. As a mucosal adjuvant, SBA-15 silica was used. Control mice were immunized with non-recombinant BCG or Smeg or with PBS following the same immunization schedule. A significantly higher level of anti-BfpA and anti-intimin IgA or IgG antibodies was observed in both the feces and serum of mice immunized with rBCG or rSmeg as compared with that of serum collected in the groups that received non-recombinant BCG or Smeg or PBS ($p < 0.001$) (Fig. 2A and B). Pre-immune sera and feces that were collected and pooled were

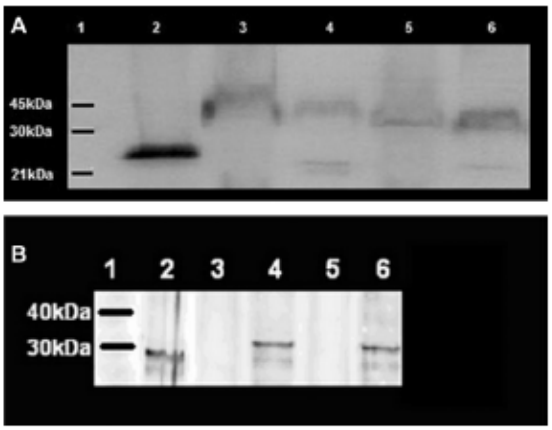


Fig. 1. Expression of BfpA by recombinant Smeg and BCG vaccine strains. (A) Whole extracts (30 μg) of recombinant bacteria strains were resolved on SDS-PAGE and BfpA protein identified by Immunoblotting using specific polyclonal mouse IgG antibody as the first antibody. Lane 1, MW; Lane 2, purified BfpA; Lane 3, native Smeg; Lane 4, Smeg-BfpA; Lane 5, native BCG; and Lane 6, BCG-BfpA. (B) Expression of intimin by recombinant Smeg and BCG vaccine strains. Whole extracts (30 μg) of recombinant bacteria strains were resolved on SDS-PAGE and intimin protein identified by Immunoblotting using specific polyclonal mouse IgG antibody as the first antibody. Lane 1, MW; Lane 2, purified intimin; Lane 3, native Smeg; Lane 4, Smeg-intimin; Lane 5, native BCG; and Lane 6, BCG-intimin.

evaluated, and presented no reactivity to BfpA or intimin (data not shown), suggesting the absence of anti-BfpA or anti-intimin antibodies prior to immunization. Our analysis of serum IgG subclass responses also revealed that mice subjected to intraperitoneal immunization predominantly developed an IgG2a response, indicating a Th1-type cell response (Fig. 2C).

3.3. Development of a prevailing Th1-type cell response pattern

To evaluate the involvement of Th1-type cells on the immune responses induced by recombinant BCG-bfpA, BCG-intimin, Smeg-bfpA and Smeg-intimin, spleen cells were recovered 15 days after the final immunization and treated in vitro with the corresponding recombinant protein expressed in the vaccine used. We assayed the supernatants for the presence of the cytokines TNF-α, IFN-γ, IL-4 and IL-5. As is shown in Fig. 2A–C, anti-BfpA and anti-intimin, respectively, IgA and IgG antibodies were detected in feces and serum. Immunization with recombinant vaccine expressing BfpA induced higher production of IFN-γ, in vitro, by spleen cells (Fig. 3). The vaccination of mice with recombinant BCG or Smeg expressing intimin induced higher levels of TNF-α and IFN-γ production, in vitro, by spleen cells (Fig. 4).

3.4. Immunization with recombinant BCG and Smeg induces antibodies that inhibit EPEC (E2348/69) binding to Hep-2 cells in vitro

EPEC samples (E2348/69) pre-treated for 3 h with dilutions of serum or fecal extracts obtained from mice immunized with BCG-*bfpA*, BCG-*intimin*, Smeg-*bfpA* or Smeg-*intimin*, were added to HEp-2 monolayers cultivated on coverslips. As a negative control, EPEC (E2348/69) samples were similarly pre-treated with dilutions of serum or feces collected prior to the immunizations. After incubation for 3 h at 37 °C, the coverslips were stained and examined by light microscopy. Untreated EPEC (E2348/69) typically displays a localized pattern of adhesion, generating tight microcolonies of bacteria on the epithelial cell surface. As shown in Fig. 5A–C,

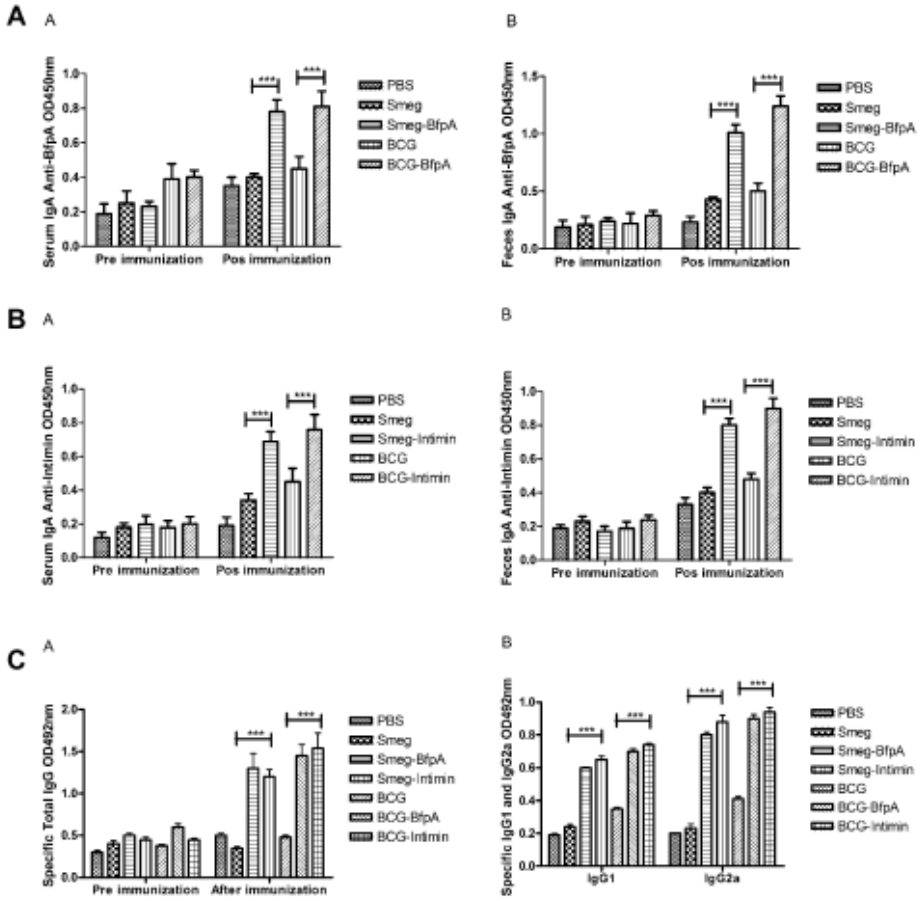


Fig. 2. Detection of serum and feces antibodies IgA before and after oral immunization. (A) Serum (A) and feces (B) from immunized mice with four p.o. doses containing 108 CFU/200 μL of Smeg-BfpA or BCG-BfpA or control group (PBS, native Smeg and native BCG) with SBA-15 adjuvant were collected on days 0 and 60 and the specific IgA antibody anti-BfpA was analyzed by ELISA. (B) Detection of serum and feces antibodies IgA before and after oral immunization. Serum (A) and feces (B) from immunizaded mice with four p.o. doses containing 108 CFU/200 μL of Smeg-intimin or BCG-intimin or control group (PBS, native Smeg and native BCG) with SBA-15 adjuvant, were collected on days 0 and 60 and the specific IgA antibody anti-intimin was analyzed by ELISA. (C) Detection of serum total specific antibodies IgG and isotypes IgG1 and IgG2a after intraperitoneal immunization. Serum antibodies total IgG (A) and isotypes (B) anti-BfpA and anti-intimin were determined by ELISA from mice immunized four times with recombinant vaccine Smeg-BfpA or Smeg-intimin (1 × 108 ufc/200 μL) or BCG-BfpA or BCG-intimin (1 × 108 ufc/200 μL) without SBA-15. Mice immunized with PBS or Smeg or BCG was used as negative controls. t-Student ***p< 0.001.

adherence of EPEC (E2348/69) cells pre-treated with dilutions of immune serum or fecal extracts was blocked by over 90%. In contrast, in EPEC (E2348/69) cells pre-treated with dilutions of serum or feces collected before immunization, adherence was blocked by less than 5%.

4. Discussion

Attenuated *M. bovis* BCG vaccine strains have been intensively investigated as a vehicle for delivering heterologous antigens and allowing the induction of both humoral (mucosal and systemic) and cell-mediated immune responses [21].

In this study, we used recombinant BCG that expressed BfpA or intimin as vaccines against EPEC. As an alternative, *M. smegmatis* was also used to present the BfpA and intimin antigens to the host. It is interesting to note that the recombinant strains of both species were able to induce systemic and mucosal BfpA and intimin-specific antibody responses with adherence-neutralizing activity following oral administration to mice. This evidence demonstrates that the different rBCG-EPEC or Smeg-EPEC vaccine strains are potential live vectors for the generation of strategies to prevent EPEC.

Three important qualities for a recombinant vaccine were positively evaluated in our study. First, a live attenuated vaccine was constructed with the ability to express two important proteins, BfpA and intimin, involved in the pathogenesis of EPEC. Second, the expression of the recombinant proteins induced specific and long lasting immune response in immunized mice, characterized by serum and mucosal IgG and IgA antibodies. The third important property of our recombinants is that the induced antibodies were able to prevent, in in vitro EPEC adherence to HEp-2 cells. IgA production was probably enhanced by the adjuvant effects of mesoporous silica SBA-15 [20].

SBA-15 is a nontoxic positive modulator of the mucosal immune response even in low immune responsive mice and is a natural candidate to be included as an adjuvant in an anti-EPEC vaccine. The anti-EPEC antibodies specifically recognize recombinant and native BfpA and intimin proteins free in solution and naturally fixed on the bacterial cell surfaces (Fig. 1A and B). The significant production of TNF-α and IFN-γ identifies BfpA and intimin as

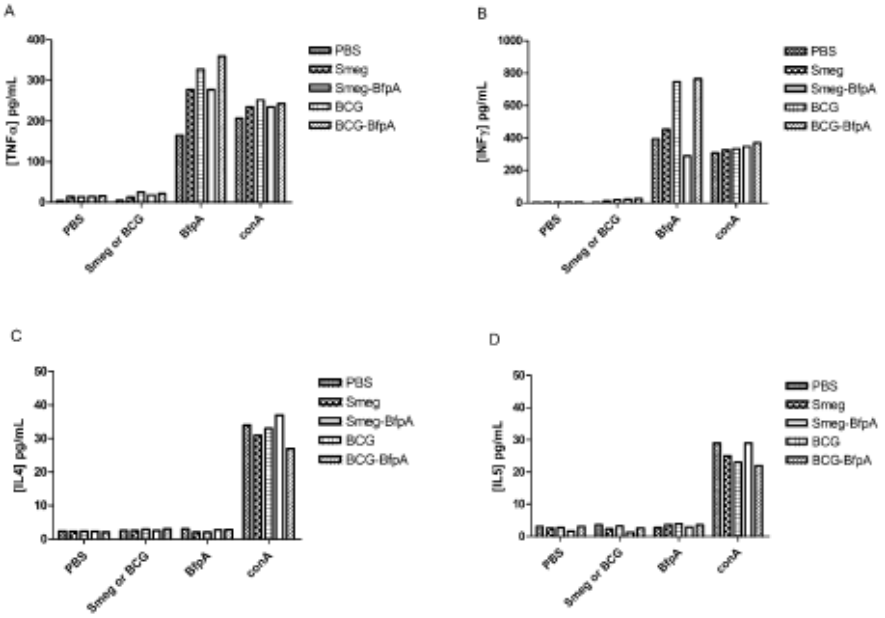


Fig. 3. Detection of cytokine production after in vitro stimulation of spleen cells from mice orally immunized with recombinant vaccines expressing recombinant BfpA. Antigen specific production of TNF-α (A); IFN-γ (B); IL-4 (C); and IL-5 (D) by spleen cells from mice immunized by the oral route with Smeg-BfpA or BCG-BfpA, was measured after stimulus with total extract soluble proteins of Smeg or BCG (25 μg/mL); purified recombinant protein BfpA (25 μg/mL) and ConA (5 μg/mL), as positive control. Presented results are representative of 3 independent experiments.

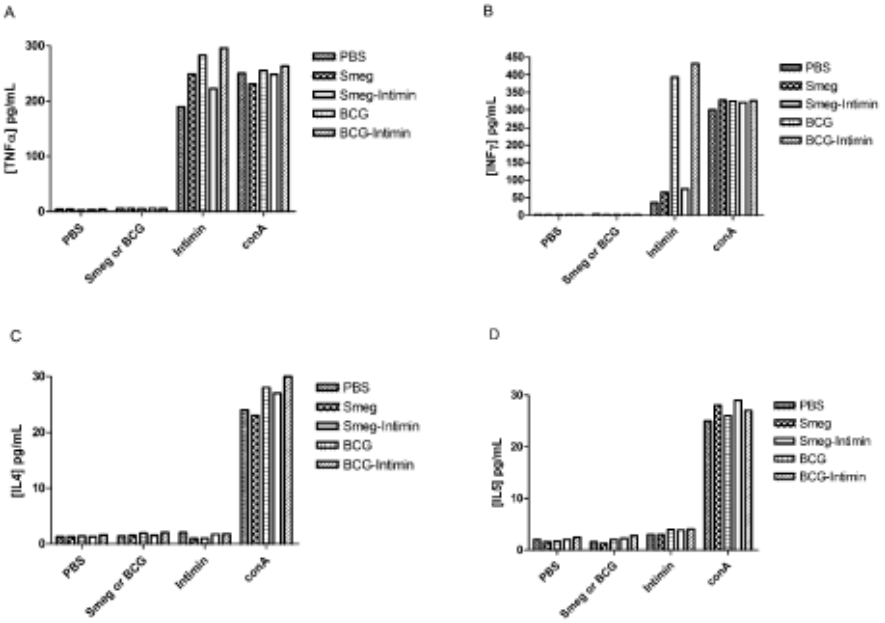


Fig. 4. Detection of cytokines production after stimulation of spleen cells in vitro from mice orally immunized with recombinant vaccines expressing protein intimin. Antigen specific production of TNF-α (A); IFN-γ (B); IL-4 (C); and IL-5 (D) by spleen cells from mice immunized by the oral route with Smeg-intimin or BCG-intimin, was measured after stimulus with total extract soluble proteins of Smeg or BCG (25 μg/mL); purified recombinant protein intimin (25 μg/mL) and ConA (5 μg/mL), as positive control. Presented results are representative of 3 independent experiments.

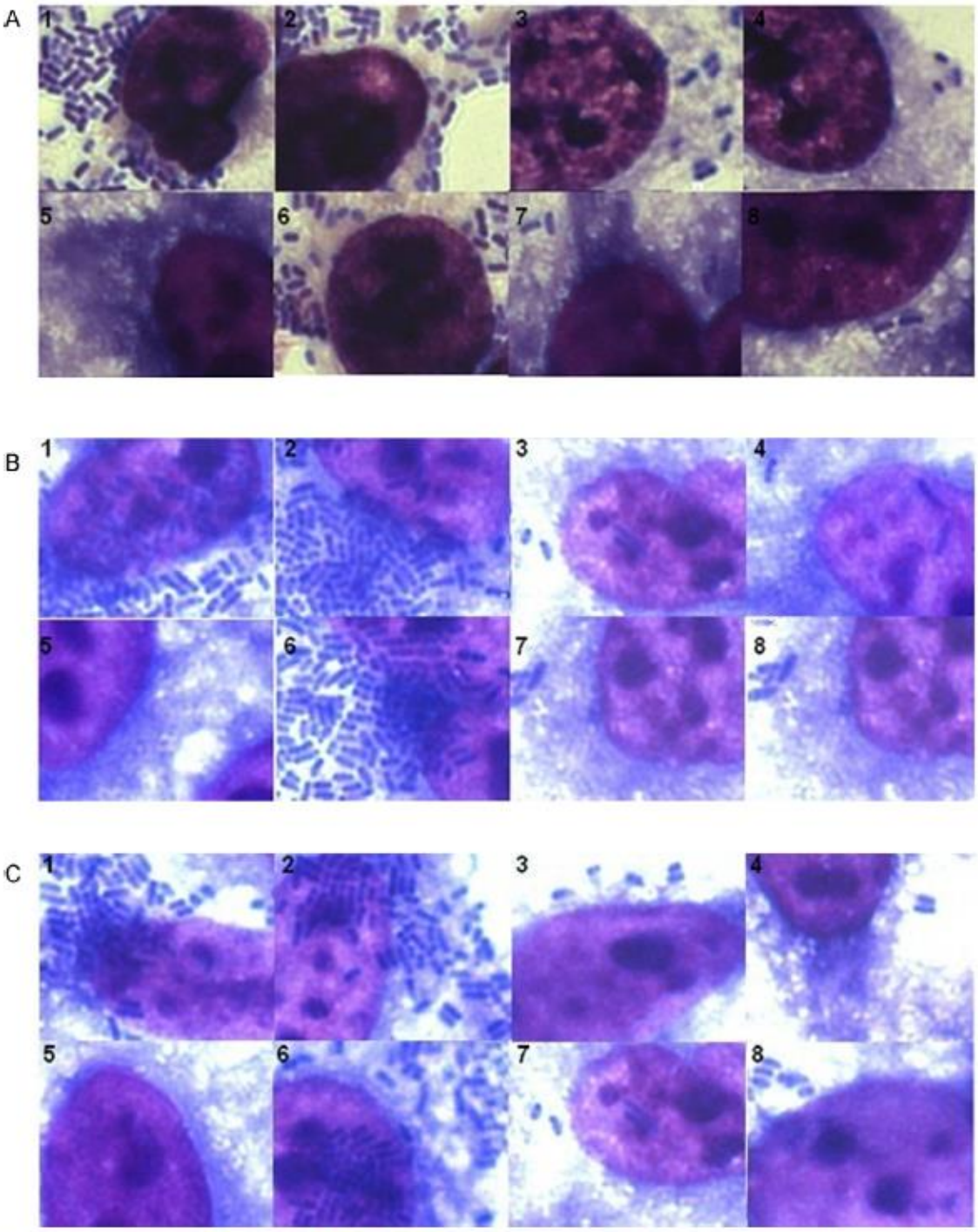


Fig. 5. Inhibition of binding properties of virulence factors BfpA and intimin by serum and feces samples collected from mice 15 days after last orally immunization. The EPEC E2348/69 strain was incubated with different serum or feces samples for 1 h at 37 °C, at a final dilution of 1:4 with 10^7 EPEC, before being added to HEp-2 cell cultures. The inhibition of bacterial binding was evaluated by assays using feces (A1) or serum pools (B1 and C1) from PBS immunized mice, feces (A2) or serum (B2 and C2) pools from mice orally immunized with Smeg, feces (A3) or serum (B3 and C3) pools from mice orally immunized with Smeg-*bfpA*, feces (A4) or serum pools from mice orally immunized Smeg-intimin (B4 and C4), Hep-2 cells culture (A5, B5 and C5), feces (A6) or serum (B6 and C6) pools from mice orally immunized with BCG, feces (A7) or serum (B7 and C7) pools from mice orally immunized with BCG-bfpA, and feces (A8) or serum (B8 and C8) pools from mice orally immunized with BCG-intimin. The results are representative of three independent experiments with the same observed results.

inducers of cellular immunity [22,23]. Although TNF participates in the immune destruction of several infectious microbes [22], TNF was first identified in the plasma of LPS-treated animals exhibiting the Shwartzman reaction [23]. The positive and negative effects of TNF must be taken into account when its production is induced by candidates for protective vaccines. Although in vitro assays cannot entirely be used as substitutes for in vivo methods, the effective and specific blockage of bacterial attachment to HEp-2 cells strongly indicates that the antibodies induced by the recombinant Smeg and BCG generated to express BfpA and/or intimin may be active in vivo.

In a previous study, we demonstrated that an IgY antibody raised against recombinant BfpA identifies *E. coli* that express BfpA, blocks colonization of HeLa cells by EPEC-EAF$^{(+)}$ in vitro and inhibits the in vitro growth of EPEC-EAF$^{(+)}$ but not of EPEC-EAF$^{(-)}$ (the BfpA-cured counterpart bacteria) [24]. More recently, we also showed that EPEC-EAF$^{(+)}$-expressing BfpA, but not EPEC-EAF$^{(-)}$, induced apoptosis in HeLa cells. This effect was blocked by prior neutralization of BfpA with an IgY anti-BFP antibody [25]. These data agree with previous observations indicating that induction of epithelial cell death by *E. coli* depends on the expression of bundle-forming pili by the bacterium [26]. Therefore, BfpA is an important virulence factor expressed by EPEC and is significantly involved in bacterial cell adhesion and induction of host cell death, either by necrosis or apoptosis. Intimin is a 94–97 kDa outer membrane protein [4] that mediates intimate contact between the bacteria and the target cell upon interaction with its translocated intimin receptor (Tir) [27]. Recent observations indicate that *Lactobacillus casei* expressing intimin-β fragments and containing the immunodominant epitopes of Int_{280} induced both humoral and cellular immune responses in mice. The antibodies were able to bind to EPEC and inhibit bacterial adhesion to the epithelial cell surface in vitro. C57BL/6 mice immunized with this recombinant strain became partially protected against intestinal colonization by *Citrobacter rodentium*, a mouse intestinal pathogen that also expresses intimin-β [28]. BfpA and intimin are therefore significant immunogens to be used in vaccines.

Acknowledgments

We would like to thank the following individuals: Dr. Luciana C.C. Leite, Butantan Institute, São Paulo, Brazil, for her assistance and permission to use the Laboratory of Biotechnology IV; Dr. Brigitte Gicquel, Institute Pasteur, Paris, France, for providing the pMIP12 vector; Dr. Albert Schriefer, Fiocruz Institute, *Salvador*, Brazil, for providing the original enteropathogenic *E. coli* (EPEC)-EAF$^{(+)}$ and -EAF$^{(-)}$ strains; and Dr. Dunia Rodriguez for expert laboratory help and assistance in our results. "SBA-15 silica" was kindly provided by Osvaldo Augusto SantiAnna, Butantan Institute, Brazil.

This work was supported by grants from the following: CNPq, for the fellowship to the post-graduate student Halyka Luzório Franzotti Vasconcellos; FAPERJ, "Programa–Cientistas de Nosso Estado", Proc. No.: E–26/100.628/200; CNPq: Bolsa de Produtividade (WDS) Nível 1A, Proc. No.: 301836/2005-1, FAPESP Proc. No.: 09/52804-0 and BZG.

Conflict of Interest statement: The authors have no financial conflict of interest. This research is under the scope of the International Patents WO 07030901, IN248654, ZA2008/02277, KR 1089400 and MX297263.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.05.083.

References

[1] Clark S, Haigh R, Freestone P, Williams P. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. Clin Microbiol Rev 2003:365–78.
[2] Alrifai SB, Alsaadi A, Mahmood YA, Ali AA, Al-Kaisi LA. Prevalence and etiology of nosocomial diarrhea in children 5 years in Tikrit teaching hospital. East Mediterr Health J 2009;15:111–8.
[3] Donnenberg MS, Giron JA, Nataro JP, Kaper JB. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. Mol Microbiol 1992;6:3427–37.
[4] Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1990;87:7839–43.
[5] Kenny B. Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. Mol Microbiol 1999;31:1229–41.
[6] Fitzhenry R, Pickard D, Hartland EL, Reece S, Dougan G, Phillips AD. Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Gut 2002;50:80–5.
[7] Ito K, Lida M, Yamazaki M, Moriya K, Moroishi S, Yatsuyanagi J, et al. Intimin types determined by heteroduplex mobility assay 433 of intimin gene (eae)-positive *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol 2007;45:1038–41.
[8] Mora A, Blanco M, Yamamoto D, Dahbi G, Blanco JE, López C. HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different eae and tir alleles. Int Microbiol 2009;12:243–51.
[9] Aidar-Ugrinovich L, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Leomil L, Dahbi G, et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in Sao Paulo, Brazil. Int J Food Microbiol 2007;115:297–306.
[10] Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marches O, Caprioli A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. Infect Immun 2000;68:64–71.
[11] Ramachandran V, Brett K, Hornitzky MA, Dowton M, Bettelheim KA, Walker MJ, et al. Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources. J Clin Microbiol 2003;41:5022–32.
[12] Girón JA, Ho AS, Schoolnik GK. An inducible bundle forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. Science 1991;254:710–3.
[13] Baldini MM, Kaper JB, Levine MM, Candy DC, Moon HW. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1983;2:534–8.
[14] Stone KD, Zhang HZ, Carlson LK, Donnenberg MS. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. Mol Microbiol 1996;20:325–37.
[15] Sohel I, Puente L, Ramer SW, Bieber D, Wu C-Y, Scoolnik GK. Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. J Bacteriol 1996;178:2613–28.
[16] Aldovini A, Young RA. Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines. Nature 1991;351:479–82.
[17] Ohara N, Yamada T. Recombinant BCG vaccines. Vaccine 2001;19:4089–98.
[18] Giles TR. História da Educação. São Paulo: EPU; 1987.
[19] Parish T, Stoker NG. Electroporation of mycobacteria. Methods Mol Biol 1995;47:237–52.
[20] Carvalho LV, Ruiz RC, Scaramuzzi K, Marengo EB, Matos JR, Tambourgi DV, et al. Anna OA. Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15. Vaccine 2010;28:7829–36.
[21] Nascimento IP, Dias WO, Mazzantini RP, Miyaji EN, Gamberini M, Quintilio Gebara VC, et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing pertussis toxin subunit S1 induces protection against an intracerebral challenge with live *Bordetella pertussis* in mice. Infect Immun 2000;68:4877–83.
[22] Long KZ, Rosado JL, Santos JI, Haas M, Mamum AA, DuPont HL, et al. Associations between mucosal innate and adaptive immune responses and resolution of diarrheal pathogen infections. Infect Immun 2010;78:1221–8.
[23] Harendra de Silva DG, Mendis LN, Sheron N, Alexander GJM, Candy DCA, Chart H, et al. Concentrations of interleukin 6 and tumour necrosis factor in serum and stools of children with *Shigella dysenteriae* infection. Gut 1993;34:194–8.
[24] Almeida CMC, Quintana-Flores VM, Medina-Acosta E, Schriefer A, Barral-Netto M, Dias da Silva W. Egg yolk anti-BfpA antibodies as a tool for recognizing and identify enteropathogenic *Escherichia coli*. Scand J Immunol 2003;57:573–82.
[25] Melo AR, Lasunskaia EB, Almeida CMC, Schriefer A, Kipnis TL, Dias da Silva W. Expression of the virulence factor, BfpA, by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for apoptosis signaling but not for NF-κB activation in host cells. Scand J Immunol 2005;61:511–610.
[26] Khursigara C, Abul-Milh M, Lau B, Giron JA, Lingwood CA, Foster DEB. Enteropathogenic *Escherichia coli* virulence factor bundle-forming pilus has a binding specificity for phosphatidylethanolamine. Infect Immun 2001;69:6573–9.
[27] Kenny B, Abe A, Stein M, Finlay BB. Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. Infect Immun 1997;65:2606–12.
[28] Ferreira PCD, da Silva JB, Piazza RMF, Eckmann L, Ho PL, Oliveira MLS. Immunization of mice with *Lactobacillus casei* expressing a beta-intimin fragment reduces intestinal colonization by *Citrobacter rodentium*. Clin Vaccine Immunol 2011;18:1823–33.

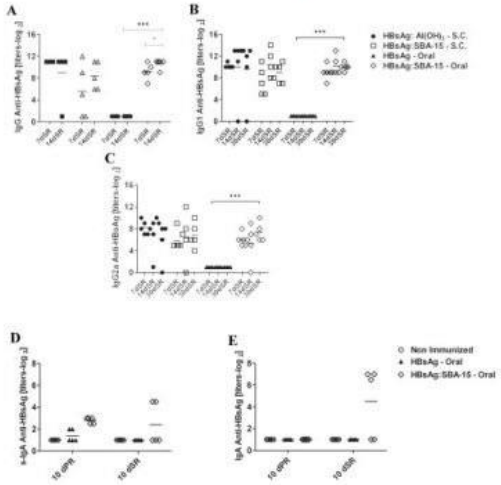
APÊNDICE E – Resumo:

SCARAMUZZI, K.; OLIVEIRA, D.; CARVALHO, L.V.; RIZZI, M.; MUSSALEM, J.; FANTINI, M.C.A.; BOTOSSO, V.; SANT'ANNA, O.A. Hepatites B nanovaccine: The use of SBA-15 Silica as an Oral Adjuvant.**15th International Congress of Mucosal Immunology – ICMI, Paris, France**, v.1, p. 173, 2011. Disponível em: http://www.socmucimm.org/images/icmi2011/abstract%20supplement%20-%20chronological%207-18-2011.pdf

F.166. Hepatitis B Nanovaccine: The Use of SBA-15 Silica as an Oral Adjuvant

Karina Scaramuzzi[1], Denise Oliveira[2], Luciana Carvalho[1], Marisa Rizzi[3], Juliana Mussalem[3], Márcia Fantini[4], Viviane Botosso[2], Osvaldo Sant Anna[1]. [1]Butantan Institute, São Paulo, Brazil; [2]Butantan Institute, São Paulo, Brazil; [3]Cristália Pharmaceutics, São Paulo, Brazil; [4]Physics Institute, University of São Paulo. Brazil, São Paulo, Brazil

SBA-15 is an inorganic material with ordered channels of hexagonal nanostrutured pores able to interact with atoms, ions and molecules. We aim to prove the applicability of SBA-15 as an adjuvant in oral immunizations with HBsAg, the main component of Hepatitis B vaccine. Groups of female 8 week-old BALB/c mice received subcutaneously [s.c.] or orally, 0.5 µg of HBsAg encapsulated/adsorbed on SBA-15 or adsorbed on Al[OH]3 in a final volume of 0.25 mL PBS. Boosters were administered 30 and 110 days after first immunization. Serum and fecal samples were collected for specific antibodies titration.



Analysis of s-IgA showed that mice orally immunized with HBsAg on SBA-15 had increased levels of specific antibodies at day 14 post first immunization [3 log2] and at day 7 after booster [4 log2]. Serum IgA [3.5 log2] and IgG [10 log2] titers in HBsAg:SBA-15 orally immunized mice remained the same after the second dose. Immunizations with Al[OH]3 [s.c.] showed detectable serum IgA titers only 7 days after the third dose [4 log2] and IgG levels were 11 log2. Our results indicate the promising use of SBA-15 as an oral adjuvant due to the physical protection of antigens and the efficient activation of the immune system.

APÊNDICE F – Apresentação oral:

SCARAMUZZI, K.; TANAKA, G.D.; TINO DE FRANCO, M.; TREZENA, A.G.; SANT'ANNA, O.A. SBA-15 nanostructured silica adjuvant enhances immune responsiveness and modulates sensibility to bacterial toxins. 15th International Congress of Immunology – ICI, Milão, Itália, v.1, p. 65, 2013. Disponível em: http://www.ici2013.org/pdf/uploads/abstracts-book.pdf

BOOK OF ABSTRACTS

Co-Editors: Luciano Adorini, Massimo Locati

ANNOTATIONS

In the following we are publishing the abstracts as submitted by the authors.

Missing session numbers represent sessions with no abstracts associated.
Missing presentation numbers represent talks with no abstracts received as per date of production. Bold presentation numbers indicate the presenting author.

The sessions are in numerical order.

Keys and Abbreviations:

IL1.01.01	Invited Lecture
LB.1	Late Breaking Session 01
LL.1	Lunchtime Lecture
P1.01	Poster Presentation
PL.1	Plenary Lecture
PS.1	Lecture: Perspectives in Immunology
S.1	Symposium
SS.1	Sponsored Session
W1.01	Workshop

The Editors

ORAL PRESENTATIONS

Plenary Lectures

centers (GCs). We also demonstrated that the activation of FDCs is necessary but not sufficient to detect GC formation and that both antigen trapping by FDCs and generation of GCs requires IC formation and cell activation. Taken together all these findings strongly suggest that the antigen retention within lymphoid organs affects the quality of the humoral immune response. The elucidation of the way MF59 enhances antigen retention will help to improve the efficacy of emulsions as vaccine adjuvants.

W6.09.06
SBA-15 nanostructured silica adjuvant enhances immune responsiveness and modulates sensibility to bacterial toxins

K. Scaramuzzi[1,2], G. D. Tanaka[1,2], M. Tino De Franco[1,3], A. G. Trezena[1,4], O. A. Sant'Anna[1,2];
[1]Butantan Institute, Sao Paulo, Brazil, [2]Immunochemistry Laboratory, Butantan Institute, Sao Paulo, Brazil, [3]Immunogenetics Laboratory, Butantan Institute, Brazil, Sao Paulo, Brazil, [4]Immunogenetics Laboratory, Butantan Institute, Sao Paulo, Brazil.

Silicon oxide particles formed of ordered nanopores (SBA-15) are promising adjuvant vectors. Here we explored how silica might act in the enhancement of phagocytosis, the recruitment of inflammatory cells and also in the modulation of toxicity after administration of exo or endotoxins encapsulated in SBA-15. Confocal microscopy and flow cytometry tests confirmed that the pre-incubation of FITC labelled ovalbumin with SBA-15 improved the phagocytosis of the protein by bone marrow derived DC from C57BL/6 mice. The recruitment of cells evaluated by flow cytometry after 24 and 72 hours of subcutaneous injection of SBA-15 showed the presence of inflammatory cells at the site of injection, especially mature DC. BALB/c mice intraperitoneally immunised (ip) with diphtheria toxin (1 µg/mL): SBA-15 (25 µg/mL) presented 100% of survival rate whereas all mice that received diphtheria toxin (1 µg/mL): Alum (25 µg/mL) died. However, BALB/c mice inoculated ip with LPS from Salmonella typhimurium (100 µg/mL) in SBA-15 (1000 µg/mL) showed a higher death percentage (55%) compared to the LPS (100 µg/mL):Alum (1000 µg/mL) group (36%). Though, both experimental groups were able to produce similar specific antibody titres indicating that SBA-15 worked well as immunological adjuvant, reducing the toxicity of the diphtheria toxin in immunisations but increasing the death of mice injected with LPS. These data confirm that SBA-15 acts as adjuvant for antibody responses and suggest that its effects may reflect enhanced availability of antigen without modifying its properties.

W6.10 Mucosal vaccines

IL6.10.01
Acute epithelial death plays a role in intrinsic defense against enteric bacteria

M. Kweon;
Mucosal Immunology Section, International Vaccine Institute, Seoul, Republic of Korea.

The interactions of host and microbes, including those commensal and pathogenic, in the mucosal compartments are currently one of the hot topics in immunology field. Further, host cell death is critical to the fate
of bacterial infection, to host innate immune responses, and to disease outcome. "The demise of infected cells" plays a pivotal role in sacrificing damaged cells, eliminating pathogens, limiting microbial replication, and emitting alarm signals. Previous studies demonstrated that *Shigella* invasion induces both necrosis-like death in the epithelial cells and apoptosis-like death in the macrophages via a caspase-1-independent manner. In contrast, bacterial pathogens deploy multiple mechanisms to postpone host cell death and favor infection. Here we found that *Shigellae* can invade the terminal ileum of murine small intestine at 1 hour of the early phase but are rapidly cleared within 24 hours. At early phase, we found several histological changes without inflammation including epithelial shedding and cell death in the lamina propria and crypt. Dead products, including DNA and intracellular organelles, trapped *Shigellae* and then damaged tissue was mostly recovered within a day. These acute responses were general events against human-specific pathogens such as *E. coli* as well as murine-specific pathogens such as *Citrobacter rodentium*. Interestingly, the human intestine also shares this intrinsic defense. Therefore, we propose the concept of a general intrinsic mechanism that repels the initial introduction of enteropathogenic bacteria by sacrificing hazardous host cells. To overcome this defense mechanism and successfully disseminate, some pathogens may have evasion strategies

IL6.10.02
Novel HIV-1 IL-13Rα2 adjuvanted vaccines: High avidity mucosal and systemic CD8 T cells with greater protective immunity

C. Ranasinghe, S. Trivedi, D. K. Wijesundara, R. J. Jackson;
The John Curtin School of Medical Research, The Australian National University, Canberra, Australia.

Our studies have demonstrated that compared to a purely systemic (intramuscular - i.m.) HIV-1 prime-boost immunisation, mucosal (intranasal - i.n.) immunisation can induce cytotoxic CD8 T cells (CTL) of higher avidity with lower IL-4/IL-13 activity and better protective immunity. Our recent studies, indicate that co-expression of IL-13Rα2 soluble or membrane bound receptors together with HIV-1 vaccine antigens in an i.n./i.m pox viral prime-boost vaccination modality can i) dramatically enhance HIV-specific systemic and mucosal CTL avidity and multi-functionality. ii) Also following a surrogate mucosal HIV-1 challenge induce excellent protective immunity similar to an IL-13 gene knockout animal. When how the transient inhibition of IL-13 could induce high avidity CTL were investigated, data revealed that i) CD8 T cell avidity is defined at the vaccination site the lung mucosae at very early stages of priming and ii) according to the antigen presenting cell subsets these vaccines induce or recruit. Moreover at the T cell level, the down-regulation of IL-4Rα densities on effector CD8 T cells and up-regulation of CD8α/β co-receptors play a critical role in modulating CD8 T cell avidity. Our findings not only offer exciting prospects for a future HIV-1 vaccine development but also many other chronic mucosal infections where high avidity CD8 T cells are required for protection.
Disclosure: This work was supported by the Australian NHMRC project /development grant awards 525431/ APP1000703(CR), ACH2 EOI grant 2010 (CR) and Bill and Melinda Gates Foundation GCE Phase I grant OPP1015149 (CR).

W6.10.01
Microbe-dependent proliferating IgA-producing plasma cells mediate early-phase robust intestinal IgA responses in mice

J. Kunisawa[1,2], E. Hashimoto[1], I. Ishikawa[1], Y. Suzuki[1], R. Sumiya[1], S. Shikata[1], H. Kiyono[1];
[1]The University of Tokyo, Tokyo, Japan, [2]National Institute of Biomedical Innovation, Osaka, Japan.

Intestinal plasma cells (PCs) predominantly produce IgA, but their immunological complexity remains obscure. Here, we show that murine intestinal IgA PCs can be newly classified into two populations on the basis of CD11b expression, which cannot be discriminated by currently known criteria such as general PC markers, B-cell origin (e.g., B1 and B2 cells), and T-cell dependence/independence. $CD11b^+$ IgA^+ PCs require the lymphoid structure of Peyer's patches, produce more IgA than $CD11b^-$ IgA^+ PCs, proliferate vigorously, and require microbial stimulation and IL-10 for their development and maintenance. The proliferating IgA^+ cells dominantly present in the $CD11b^+$ IgA^+ PCs mediate early-phase antigen-specific intestinal IgA responses induced by oral immunization with protein antigen. Indeed, preferential depletion of $CD11b^+$ IgA^+ PCs results in the significant impairment of intestinal IgA production against orally immunized antigens. These findings reveal the functional diversity of IgA^+ PCs in the murine intestine and possible target in the development of oral vaccine.