STEFANNI LILIANE CHAVEZ RICO

**Caracterização da resposta imunológica induzida por vacinas da
Influenza produzidas no Instituto Butantan formuladas com
adjuvantes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

São Paulo

2018

STEFANNI LILIANE CHAVEZ RICO

**Caracterização da resposta imunológica induzida por vacinas da
Influenza produzidas no Instituto Butantan formuladas com
adjuvantes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dr^a Alessandra Soares Schanoski

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível na Secretaria de Pós-graduação que aloja o Programa de Pós-Graduação

São Paulo

2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Chavez Rico, Stefanni Liliane
Caracterização da resposta imunológica induzida
por vacinas da Influenza produzidas no Instituto
Butantan formuladas com adjuvantes / Stefanni
Liliane Chavez Rico; orientadora Alessandra Soares
Schanoski. -- São Paulo, 2018.
96 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Influenza. 2. Adjuvante. 3. Flagelina. 4.
Emulsão de óleo em água. 5. Monofosforil Lipídio A.
I. Soares Schanoski, Alessandra, orientador. II.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Stefanni Liliane Chavez Rico

Título da Dissertação: Caracterização da resposta imunológica induzida por vacinas da Influenza produzidas no Instituto Butantan formuladas com adjuvantes

Orientador(a): Prof. Dr^a. Alessandra Soares Schanoski

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, 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:

Presidente(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Resumo

CHAVEZ-RICO, S. L. **Caracterização da resposta imunológica induzida por vacinas da Influenza produzidas no Instituto Butantan formuladas com adjuvantes.** 2018. Nº 90 Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A Influenza afeta milhões de pessoas a cada ano no mundo todo. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) informam que, anualmente, as epidemias de influenza resultam em aproximadamente 250 a 500 mil mortes no mundo. A vacinação é o modo mais eficaz de prevenção contra a influenza, e, devido à alta capacidade de transmissibilidade, a produção, a distribuição e a administração da vacina devem ser rápidas. Os vírus da influenza podem ser sazonais ou pandêmicos, dependendo das mudanças genéticas que sofrem. A produção da vacina sazonal da Influenza é um processo de alto custo e complicado devido à possibilidade de reformulação anual da vacina, além disso, vacinas em desenvolvimento contra cepas possivelmente pandêmicas, como H7N9, possuem baixa imunogenicidade. Por esses motivos, vêm-se discutindo o uso de adjuvantes as formulações das vacinas de Influenza. Desta forma, poderia ser possibilitado o uso de uma menor quantidade de antígeno, propiciando o aumento de doses produzidas e potencializando a resposta imune gerada pela vacina. Neste estudo foram utilizados quatro adjuvantes: o Monofosforil Lipídio A de *Bordetella pertussis* (MPLA), o Hidróxido de Alumínio, uma emulsão de água em óleo chamado Addavax® (formulação similar ao MF59®) e a Flagelina de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a resposta imunológica induzida pela administração das vacinas da Influenza sazonal e H7N9, produzidas no IB com o MPLA combinado com o Hidróxido de Alumínio; o Addavax® e a Flagelina de *S. Typhimurium*. Foi realizada a imunização via subcutânea (SC) de camundongos com a vacina trivalente da Influenza usando o MPLA+ hidróxido de alumínio, Flagelina ou Addavax® e só foi possível observar um aumento dos anticorpos específicos quando o adjuvante era o Addavax. Ao caracterizar a resposta imune ao Addavax® juntamente à vacina sazonal da Influenza, constatou-se uma diferença estatisticamente significativa de resposta celular e humoral, entre administrações SC e intramuscular (IM) dessa formulação. A administração IM apresentou maior produção de anticorpos específicos e neutralizantes, e foi a que mais promoveu recrutamento de APCs. Uma maior produção de anticorpos específicos e neutralizantes por esta via de administração também foi observada, quando se comparou com a administração intranasal (IN), realizada com o

adjuvante Flagelina e a vacina monovalente de H7N9. O Addavax® foi um adjuvante eficaz para a vacina trivalente produzida no IB, pois levou à produção de altos títulos de anticorpos neutralizantes com diferença estatística significativa comparada às formulações sem o adjuvante, como já descrito na literatura, e a administração IM de vacinas da Influenza foi a melhor via de imunização para o estudo destes antígenos com camundongos, pois também leva ao aumento dos títulos de anticorpos específicos e neutralizantes.

Palavras-chave: Vacina Influenza, Adjuvante, Emulsão de óleo em água, Flagelina, hidróxido de alumínio, Monofosforil lipídio A, *Bordetella pertussis*.

Abstract

CHAVEZ-RICO, S. L. **Characterization of the immunological response induced by Influenza vaccines produced at the Instituto Butantan formulated with adjuvants.** 2018. N° 90. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Influenza affects millions of people every year worldwide, and according to the World Health Organization (WHO) reports, influenza epidemics annually result in approximately 250-500,000 deaths worldwide. Vaccination is the most effective way to prevent influenza and because of the high transmissibility capacity, the production, distribution and administration of the vaccine should be fast. Influenza viruses can be seasonal or pandemic, depending on the genetic changes they undergo. The production of the seasonal influenza vaccine is a costly and complicated process due to the possibility of its annual reformulation of, in addition, vaccines under development against possibly pandemic strains, such as H7N9, present low immunogenicity. For these reasons, the use of adjuvants in the Influenza vaccines formulations has been discussed. This approach could enable the use of lower amounts of antigen, allowing the increase of doses produced and potentiating the immune response generated by the vaccine. Four adjuvants were used in this study: Bordetella pertussis Monophosphoryl Lipid A (MPLA), Aluminum Hydroxide, an oil in water emulsion named Addavax® (similar formulation to MF59®) and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Flagellin. The aim of this work was characterize the immune response induced by the administration of the seasonal Influenza and H7N9 vaccines, produced by the IB with the MPLA combined with the Aluminum Hydroxide; Addavax® and *S. Typhimurium* Flagellin. Immunization was administered subcutaneously in mice with the trivalent Influenza vaccine using MPLA + aluminum hydroxide, Flagellin or Addavax®. It was possible to observe an increase of the specific antibodies against influenza when the adjuvant Addavax was used in the formulation. When initiating the characterization of Addavax® immune response together with the seasonal Influenza vaccine, a statistically significant difference was observed between subcutaneous (SC) and intramuscular (IM) administrations of this formulation in terms of cellular and humoral immune response. IM administration showed higher production of specific and neutralizing antibodies, and recruitment of antigen-presenting cells. Increased production of specific and neutralizing antibodies by this route of administration was also observed when compared to intranasal (IN) administration with the Flagellin adjuvant and the monovalent H7N9 vaccine. Addavax® was

an effective adjuvant for the trivalent vaccine produced in IB because it led to the production of high titers of neutralizing antibodies with significant statistical difference compared to the formulations without the adjuvant, as already described in the literature. The IM administration of Influenza vaccines was the best route of immunization for the study of these antigens with mice as it also leads to the increase of specific antibody titers.

Keywords: Influenza vaccine; Adjuvant; emulsion oil in water; Flagellin; aluminum hydroxide; Monophosphoryl lipid A; *Bordetella pertussis*.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Projeto Piloto: Estudo dos mecanismos de ação do Monofosforil Lipídeo A, extraído do LPS da *Bordetella pertussis*, como adjuvante de vacinas contra influenza", **protocolo nº 1282/14**, sob a responsabilidade de Alessandra Soares Schanoski – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como 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 18/6/2014.

This is to certify that the proposal "Pilot Project: Study of Monophosphoril Lipid A, from *Bordetella pertussis* LPS, mechanisms as influenza vaccine adjuvant", **protocol nº 1282/14**, under the responsibility of Alessandra Soares Schanoski – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 6/18/2014. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto: 07/2014 - 07/2016	Nº de animais/espécie
Laboratório de Biotecnologia Molecular I	110 Camundongos Balb/c 18-20g (F) - Procedentes do Biotério da Faculdade de Medicina - USP

São Paulo, 20 de junho de 2014

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAIB)
INSTITUTO BUTANTAN

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Projeto Piloto: Estudo dos mecanismos de ação do Monofosforil Lipídeo A, extraído do LPS da *Bordetella pertussis*, como adjuvante de vacinas contra influenza", protocolo nº 1282/14, sob a responsabilidade de Alessandra Soares Schanoski - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como 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 22/7/2015.

This is to certify that the proposal "Pilot Project: Study of Monophosphoril Lipid A, from *Bordetella pertussis* LPS, mechanisms as influenza vaccine adjuvant", protocol nº 1282/14, under the responsibility of Alessandra Soares Schanoski - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) - has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 7/22/2015. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto: 07/2014 - 07/2016	Nº de animais/espécie	Observação
Laboratório de Biotecnologia Molecular I	112 Camundongos Balb/c SPF (F) - Provenientes da Faculdade de Medicina da USP	Inclusão de animais

São Paulo, 22 de julho de 2015

Dr. José Ricardo Jensen
Coordenador da CEUAIB

butantan

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA À VACINA CONTRA INFLUENZA H7N9 USANDO COMO ADJUVANTES A FLAGELINA OU UMA EMULSÃO DE ÓLEO EM ÁGUA", protocolado sob o CEUA nº 5315200116, sob a responsabilidade de **Alessandra Soares Schanoski e equipe; Stefanni Liliane Chavez Rico** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 25/02/2016.

We certify that the proposal "Immunological response characterization of the vaccine against H7N9 influenza using flagellin on an emulsion of oil-in-water as adjuvants", utilizing 70 Isogenics mice (70 females), protocol number CEUA 5315200116, under the responsibility of **Alessandra Soares Schanoski and team; Stefanni Liliane Chavez Rico** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 02/25/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2016** a **02/2018**

Área: **Biotechnology**

Procedência: **Biotério Externo**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **6 a 8 semanas**

N: **70**

Linhagem: **Balb/c**

Peso: **18 a 20 g**

Resumo: O vírus da Influenza afeta milhões de pessoas a cada ano no mundo todo e o surgimento de novos vírus de influenza pode resultar em pandemias capazes de causar mortes. Em 31 de março de 2013 foi confirmada a existência de uma cepa potencialmente mortal de influenza, A/H7N9 na China que contaminou indivíduos expostos a aves domésticas. Esta cepa apresentou uma alta taxa de mortalidade dos afetados hospitalizados. Atualmente está ocorrendo uma nova onda de casos de H7N9 na China, de acordo com a Food and Agriculture Organization (FAO) das nações unidas. A FAO diz que os atuais casos se iniciaram em outubro deste ano (2015) com dois casos humanos na província chinesa de Zhejiang provavelmente pelo vírus estar estabelecido em populações de aves chinesas (Fao, 2015). A cepa H7N9 tem gerado preocupação à Organização Mundial de Saúde por ser antigenicamente distinta dos vírus sazonais em circulação, pela possibilidade de desenvolver a habilidade de transmissão entre humanos e pelas infecções secundárias recorrentes que podem acometer principalmente a população infantil e idosa sendo que a vacina sazonal não é protetora contra infecções por H7N9. O desenvolvimento de vacinas contra subtipos de influenza H7 foi prejudicado pela baixa imunogenicidade desta hemaglutinina. Por esta razão, vários pesquisadores e produtores de vacinas propõem o uso de adjuvantes à vacina H7N9, a fim de potencializar a resposta imune e também aumentar sua futura produção. O MF59® é um adjuvante que é uma emulsão de óleo (esqualeno) em água de propriedade da empresa Novartis. Estudos comprovam a eficácia do MF59® junto à vacina da influenza, porém pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na resposta imune induzida pelo MF59® como adjuvante da vacina contra H7N9. Apesar do uso do esqualeno ter sido aprovado em 30 países, ainda está em vias de ser licenciado nos Estados Unidos e não foi ainda aprovado para ser usado no Brasil. Flagelinas são as proteínas mais abundantes que compõe o filamento do flagelo bacteriano. Elas sinalizam diretamente através de TLR5 (do inglês Toll Like Receptor 5) nas células apresentadoras de antígeno e nas células B, promovendo a diferenciação e sobrevivência de plasmócitos, e são reconhecidas como adjuvantes vacinais podendo ser um potencial adjuvante para a vacina H7N9. O objetivo deste projeto é estudar a resposta imunológica induzida pela administração da vacina H7N9 produzida no Instituto Butantan, com diferentes concentrações de antígeno (HA) formulada com adjuvantes. Os adjuvantes serão uma emulsão de óleo em água produzida pelo Instituto Butantan ou Flagelina de Salmonella typhimurium, purificada pelo grupo do Professor Luís Carlos de Souza Ferreira. Esperamos que o uso dos adjuvantes possa aumentar a imunogenicidade da vacina contra H7N9 e que assim, possamos estar mais bem preparados para uma possível pandemia.

Local do experimento: Biotério do Laboratório de Biotecnologia Molecular 1

São Paulo, 22 de junho de 2016

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

Jose Ricardo Jensen
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 09 de março de 2018
CEUA N 5315200116

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Alessandra Soares Schanoski
Área: Biotecnologia
Alessandra Soares Schanoski (orientador)

Título da proposta: "CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA À VACINA CONTRA INFLUENZA H7N9 USANDO COMO ADJUVANTES A FLAGELINA OU UMA EMULSÃO DE ÓLEO EM ÁGUA".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais IB

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 08/fevereiro/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Desculpem, me esqueci de inserir o grupo que reberá salina. Solicito, primeiramente, alteração de vigência do projeto para até 06/2018. Sendo aprovada a alteração de vigência, solicito ainda, inclusão de grupos de animais para teste da vacina H7N9 com o adjuvante IB160 (emulsão de óleo em água). Este adjuvante é idêntico ao que vínhamos usando (MF59 ou Addavax) porém o IB160 foi recentemente produzido pelo Instituto Butantan e gostaríamos de testá-lo para publicação de conclusão de mestrado da aluna Stefanni Liliane Chavez Ricco. Para este último experimento necessitaríamos mais 30 animais. A explicação detalhada dos grupos está no documento em anexo. ".

Comentário da CEUA: "".

Jose Ricardo Jensen
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

São Paulo, 21 de junho de 2017
CEUA N 5315200116

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Alessandra Soares Schanoski
Área: Biotecnologia
Alessandra Soares Schanoski (orientador)

Título da proposta: "CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA À VACINA CONTRA INFLUENZA H7N9 USANDO COMO ADJUVANTES A FLAGELINA OU UMA EMULSÃO DE ÓLEO EM ÁGUA".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais IB

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 13/junho/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicito a inclusão do uso de um vírus de influenza defectivo (não capaz de replicar) que possui substituição da porção globular da neuraminidase pelo gene que codifica a proteína RFP (red fluorescent protein) de *Discosoma* sp. Utilizaremos este vírus porque nos permitirá visualiza-lo por microscopia confocal e citometria de fluxo, já que queremos identificar as células do sistema imune que estariam associadas ao vírus, podendo assim, descrever o mecanismo de ação do adjuvante usado, o MF59 (emulsão de óleo em água). Para este último experimento necessitaríamos mais 40 animais. A solicitação à CIBIO para o uso de tal vírus é o de número 07/2017. Realizaremos o experimento somente após a aprovação da CIBIO. ".

Comentário da CEUA: "".

Jose Ricardo Jensen
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Dr^a Alessandra Soares Schanoski por ter acreditado e depositado sua confiança em mim ao longo do meu mestrado. Muito obrigada pela oportunidade, paciência, suporte e conhecimentos compartilhados.

Ao Dr. Paulo Lee Ho pelo suporte, colaboração e apoio para realização deste trabalho.

Às pesquisadoras, Dr^a Maria Leonor Sarno de Oliveira e Dr^a Eliane Namie Miyaji por estarem sempre dispostas a ajudar e pelas valiosas sugestões. As contribuições de vocês foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos pesquisadores, Dr^a. Josefa B. da Silva e Dr. Enéas de Carvalho, pelo apoio, incentivo e as agradáveis conversas durante o almoço.

Ao Prof^o Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira que nos cedeu gentilmente a Flagelina para a realização deste trabalho.

Ao Eduardo Adami e à Dr^a Milena Akamatsu pela disponibilidade e auxílio no decorrer deste tempo.

Aos meus amigos de laboratório, à “salinha” com mais amor, carinho e irmandade que eu podia sonhar. À Júlia Castro, pela conexão incrível desde que nos conhecemos, obrigada por compartilhar momentos bons e ruins e por sempre deixar o ambiente mais feliz! Ao Tasson Rodrigues pelos conselhos, honestidade, pelas horas de experimentos e por compartilhar comigo todos os loucos prazos do mestrado. À Marcela Vitarelli, pela amizade, pelas risadas e principalmente ser um exemplo para mim! À Fabiana Lauretti pela paciência e pelas conversas divertidas ou muito construtivas. À Paloma Duarte e Rafaella Tostes que apesar do “pouco” tempo de convivência, foram sempre companheiras e compreensivas. Todos vocês foram essenciais e insubstituíveis nesta etapa da minha vida!

Às funcionárias do laboratório Bacteriologia 2, à Aline Cavalher obrigada pelo suporte no laboratório, cuidados e auxílio com os animais de experimentação; À Vera Almeida pela amizade, carinho e atenção, mantendo o laboratório e biotério sempre organizados, permitindo que todos os trabalhos fossem realizados. Vocês foram muito importantes para o progresso deste projeto.

Aos meus pais, Liliana e Fernando, e meu irmão Daniel, pelo amor, incentivo e apoio, mostrando que esse caminho deveria ser seguido sem medo, independente dos obstáculos, e que com amor incondicional, nunca mediram esforços para que eu chegasse até aqui. Los amo con todo mi corazón, vocês são tudo aquilo que eu sou.

À minha família de sangue que mesmo a milhares de quilômetros (ou não), sempre se preocuparam por mim e me incentivaram aos estudos. Às minhas famílias de coração, Família Reina (Tia Cláudia, Tio Rodrigo e Juju) obrigada por me acolherem e me fazerem sentir amada e em casa na cidade da garoa; Família Rua (Tia Claudinha, Alejandra e Juli) obrigada por estarem sempre preocupadas comigo e pelos churrascos de domingo.

Ao Wilson Fernandes Sarmento Jr, por ser meu refúgio, por ouvir, torcer, ajudar, pela paciência e estímulo, mesmo quando o cansaço parecia me abater e, principalmente, por todo o amor e carinho. Obrigada por ser meu melhor amigo e compartilhar e entender esta etapa! À família Sarmento por todo o carinho e por me acolherem tão bem.

Aos meus colegas de profissão, Natália Vale (Petékia), Gabriela Daolio (Milka), Roberta Selingardi (Furunfada) e Christian Sávio (Malino), pelos jantares, barzinhos, risadas, carinho e amizade. Especialmente à Milka por dividir as ansiedades e conquistas desta nossa vida de pós-graduação e por sempre me abrigar após experimentos, aulas ou cervejas. Obrigada por trazerem um pouco da terra do nunca para a selva de São Paulo. Amo vocês e sempre estarei com vocês independente da distância.

Aos meus amigos de infância, especialmente Diana Munhoz, Gabriel Centoducatte, Verônica Massarolo e Mariana Moraes, por estarem sempre presentes, tornando meus finais de semana melhores e acreditando em mim.

Ao apoio financeiro da CAPES, CNPq, FAPESP e Fundação Butantan, pelo auxílio à pesquisa, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho.

Com vocês, queridos, divido a alegria desta experiência e a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

"Queda prohibido no sonreír a los
problemas, no luchar por lo que
quieres, abandonarlo todo por
miedo, no convertir en realidad
tus sueños."

Pablo Neruda

Lista de Figuras

Figura 1. “ <i>Antigenic Drift</i> ” e “ <i>Antigenic Shift</i> ”	25
Figura 2. Circulação global de vírus da Influenza	27
Figura 3 Distribuição dos vírus respiratórios no Brasil em 2017	28
Figura 4 Número de casos humanos confirmados de H7N9 reportados pela OMS	29
Figura 5 Desenho Experimental geral dos experimentos realizados	38
Figura 6 Componentes de um ensaio de inibição de hemaglutinação	46
Figura 7 ELISA de altas doses da VSI	51
Figura 8 ELISA da curva dose resposta dos antígenos da VSI	52
Figura 9 HI da curva dose resposta dos antígenos da VSI	53
Figura 10 Indução da sinalização da via TLR4 por MPLA de <i>B. pertussis</i> em linhagem celular HEK-Blue-mTLR4.	54
Figura 11 SDS-PAGE Flagelina.....	56
Figura 12 Determinação do melhor protocolo de aquecimento da Flagelina.....	57
Figura 13 Avaliação da funcionalidade da Flagelina	58
Figura 14 Confirmação da remoção de endotoxina da Flagelina através da linhagem celular Hek Blue expressando mTLR4.....	58
Figura 15 Quantificação de anticorpos específicos IgG de animais imunizados com VSI, MPLA e Al(OH) ₃	60
Figura 16 Determinação de anticorpos neutralizantes de animais imunizados com VSI, MPLA e Al(OH) ₃	61
Figura 17 Estratégia de análise das APCs no sangue periférico.....	62
Figura 18 Análise das DCs periféricas dos animais imunizados com VSI, Flagelina e Addavax®	63
Figura 19 Análise de populações celulares periféricas dos animais imunizados com VSI formulada com Flagelina ou Addavax®.....	64
Figura 20 Concentração de anticorpos específicos IgG1 e IgG2a em animais imunizados com VSI Flagelina e Addavax®	65
Figura 21 Determinação de anticorpos neutralizantes em animais imunizados com VSI, Flagelina e Addavax®	66
Figura 22 Análise de populações celulares periféricas dos animais imunizados com vacinas monovalentes de Influenza e Flagelina como adjuvante	67
Figura 23 Quantificação de anticorpos específicos contra H7N9 e H1N1 após a segunda	

imunização.....	68
Figura 24 Determinação dos anticorpos neutralizantes em animais imunizados com H7N9 e H1N1 com Flagelina por via SC.....	69
Figura 25 Quantificação dos anticorpos específicos em animais imunizados com H7N9 + Flagelina por diferentes vias de administração.....	70
Figura 26 Determinação dos anticorpos neutralizantes em animais imunizados com H7N9+ Flagelina por diferentes vias de administração.....	71
Figura 27 Análise das populações celulares circulantes comparando as vias de administração SC e IM.....	72
Figura 28 Análise dos macrófagos e neutrófilos periféricos após a imunização pelas vias SC e IM.....	73
Figura 29 Estratégia de análise de APCs no músculo por citometria de fluxo	74
Figura 30 Análise das populações das APCs no músculo.....	74
Figura 31 Citocinas secretadas no soro de animais imunizados com VSI e Addavax [®] pelas vias SC e IM.....	75
Figura 32 Quantificação de anticorpos específicos do soro de animais imunizados com VSI+Addavax [®] pelas vias SC e IM	76
Figura 33 Comparação na produção de anticorpos neutralizantes entre via de imunização SC e IM.....	77
Figura 34 Citocinas secretadas no sobrenadante dos linfonodos drenantes dos animais imunizados com VSI e Addavax pelas vias SC e IM	79

Lista de Tabela

Tabela 1 Antígenos monovalentes utilizados na imunização de camundongos	39
Tabela 2 Marcadores utilizados na imunofenotipagem para definir determinadas populações celulares	44
Tabela 3 Perfil de expressão de marcadores de superfície das populações celulares para citometria de fluxo.....	44
Tabela 4. Teste L.A.L. da Flagelina	55

Lista de abreviaturas e siglas

APC – *Antigen Presenting Cell* (Célula Apresentadora de Antígeno)
ELISA - *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*
FACS - *Fluorescence-activated cell sorting*
FMO - *Fluorescence minus one*
GAP - *Global Action Plan*
h – horas
HA - Hemaglutinina
HI - *Haemagglutination Inhibition Assay* (*Ensaio de Inibição da hemaglutinação*)
IB – Instituto Butantan
IFN- γ - Interferon γ
IgG - Imunoglobulina G
IL – Interleucina
L.A.L. -Limulus Amebocyte Lysate
L/D – Live and Dead
M2 - proteína de matriz 2
min – minuto
MPLA – Monofosforil Lipídio A
NA - Neuraminidase
NLRP3-*NLR family, pyrin domain containing 3*
nm - nanômetros
OPD – Ortofenilenodiamina
OMS - Organização Mundial da Saúde
PBMCs - *Perypheral Blood Mononuclear Cells*
PBS - Phosphate buffered saline
pDC – Célula Dendrítica Plasmocitóide
RDE - Receptor Destroying Enzym
SUS – Sistema Único de Saúde
SPF - *Specific Pathogen Free*
TLR - *Toll-like receptor*
TNF- α - *Tumor Necrosis Factor alpha*
VSI – Vacina Sazonal da Influenza
WHO – *World Health Organization*

Sumário

1. Introdução	23
1.1 Vírus Influenza.....	23
1.2 Epidemiologia.....	26
1.3 Resposta Imune ao vírus Influenza.....	29
1.4 Vacinas fragmentadas e inativadas da Influenza.....	32
1.5 Adjuvantes	33
1.5.1 Hidróxido de Alumínio (Al(OH) ₃)	34
1.5.2 Monofosforil Lipídio A de <i>B. pertussis</i> (MPLA).....	34
1.5.3 Flagelina	35
1.5.4 Emulsão de óleo em água	36
2. Objetivos	37
2.1 Objetivos Específicos.....	37
3. Materiais e Métodos.....	38
3.1 Desenhos Experimentais.....	38
3.2 Animais	38
3.3 Antígenos	39
3.4 MPLA de <i>Bordetella pertussis</i> e Hidróxido de Alumínio	39
3.5. Emulsão de óleo em água (Addavax [®]).....	40
3.6. Flagelina de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	40
3.6.1. Remoção excesso de lipopolissacarídeo (LPS)	40
3.6.2. Teste L.A.L. (do inglês <i>Limulus Amebocyte Lysate</i>).....	40
3.6.3. Funcionalidade Flagelina.....	41
3.6.4. Preparação flagelina para formulação vacinal.....	41
3.7. Sangrias.....	42
3.7.1. Coleta de soro	42
3.7.2. Coleta de PBMCs	42
3.8. Obtenção de tecidos e órgãos.....	42
3.8.1. Linfonodos drenantes	43
3.8.2. Tecido Muscular	43

3.9. <i>Imunofenotipagem por citometria de fluxo.</i>	43
3.10 <i>Ensaio de inibição da hemaglutinação (HI).</i>	45
3.10.1 <u>Tratamento do soro com RDE</u>	45
3.10.2 <u>Determinação das unidades hemaglutinantes do antígeno/ titulação do antígeno (vacina)</u>	46
3.10.3. <u>Inibição da hemaglutinação</u>	47
3.11 <i>Detecção de anticorpos por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)</i>	47
3.12. <i>Imunoensaio para avaliação da secreção de citocinas e quimiocinas</i>	48
3.13 <i>Análises estatísticas.</i>	49
3.14 <i>Soluções.</i>	49
4. Resultados	50
4.1. <i>Determinação das doses teste das vacinas da Influenza.</i>	50
4.2. <i>Validação dos Adjuvantes por ensaios in vitro</i>	54
4.2.1 <u>MPLA do LPS de <i>B. pertussis</i>.</u>	54
4.2.2 <u>Flagelina</u>	55
4.2.2. <u>Emulsão de óleo em água (Addavax).</u>	59
4.3 <i>Escolha do Adjuvante mais eficaz para vacinas da Influenza.</i>	59
4.3.1 <u>MPLA do LPS de <i>B. pertussis</i> e Hidróxido de alumínio como adjuvantes para a VSI ..</u>	59
4.3.2 <u>Flagelina e Addavax® como adjuvantes para a VSI administrados pela via SC</u>	61
4.3.3 <u>Flagelina como adjuvante para as vacinas monovalentes de H1N1 e H7N9 administrada pela via SC.</u>	67
4.3.4 <u>Flagelina como adjuvante para a vacina monovalente H7N9 pela via IM e intranasal (IN)</u>	69
4.4. <i>Emulsão de óleo em água como adjuvante para VSI</i>	71
5. Discussão	80
6. Conclusões	85
Referências	86
ANEXOS	94

1. Introdução

1.1 *Vírus Influenza*

Os vírus da Influenza pertencem à família Orthomyxoviridae. Esta família é composta por vírus envelopados, constituídos por oito segmentos de RNA de fita simples com polaridade negativa. Existem três gêneros de influenza: A, B e C, sendo A e B os únicos relevantes clinicamente para humanos. (Lamb e Krug, 2001).

O vírus Influenza do tipo C causa infecções respiratórias brandas, sendo associado a casos esporádicos de infecção e não a epidemias, por isso não possui impacto na saúde pública. Os do tipo B possuem duas linhagens, a Victoria e a Yamagata, devido às áreas onde foram identificadas pela primeira vez. Os vírus do tipo A são divididos em subtipos, de acordo com a variedade específica e as combinações de duas glicoproteínas presentes em suas superfícies: a Hemaglutinina (HA) e a Neuraminidase (NA). Estas glicoproteínas originam a denominação H1N1, H5N1, H3N2 e etc (Klenk e Stoffel, 1955; Gottschalk, 1957; Gamblin e Skehel, 2010).

HA e NA são as principais glicoproteínas de superfície do vírus da Influenza, juntamente a elas e, em proporções menores, está a proteína de matriz 2 (M2). A HA é a glicoproteína que está em maior quantidade, sua função é de adesão à célula do hospedeiro, pois ela se liga ao ácido siálico da membrana de células do sistema respiratório do hospedeiro e após esta ligação, a partícula viral é internalizada na célula por meio da formação de endossomas. O nome “hemaglutinina” vem da habilidade de se ligar, reconhecer células e aglutinar hemácias. Sua numeração (por exemplo H1, H3, H2) é dada com base na variação de seus aminoácidos (Wiley e Skehel, 1987).

A proteína M2 auxilia a hemaglutinina na fusão à célula do hospedeiro, esta proteína do envelope viral muda sua conformação formando poros iônicos no vírus, importantes para a invasão da célula. A NA é a segunda glicoproteína mais abundante da superfície viral, também reconhece o ácido siálico da membrana celular, porém possui função diferente de HA. A NA permite que o vírus, recém-sintetizado, seja liberado para então infectar outra célula. O vírus possui outras proteínas que se localizam no interior do envelope viral que são importantes, principalmente, para a montagem (M1 e NP) e replicação do genoma viral (polimerases) (F. *et al.*, 2007).

Os vírus influenza A e B apresentam maior importância clínica por serem responsáveis por epidemias sazonais, sendo o vírus influenza A responsável pelas grandes

pandemias. Esses eventos ocorrem devido ao “*antigenic drift*” e ao “*antigenic shift*” e são resultados das altas taxas de mutação durante a fase de replicação, em especial da HA e NA. Essas mutações, que ocorrem durante a replicação do Influenza, provocam o aparecimento de novas variantes, permitindo que o novo vírus “escape” do sistema imune do hospedeiro, possibilitando assim a reinfecção (Dowdle *et al.*, 1974; Kilbourne, 1975; Webster *et al.*, 1975; Stuart-Harris, 1979).

“*Antigenic drift*” são mutações graduais nas proteínas da superfície do vírus, que geram a necessidade da reformulação anual da vacina sazonal da Influenza (VSI), pois, por essas mudanças, o sistema imune pode não reconhecer os novos vírus, mesmo que sejam derivados de um subtipo pelo qual o hospedeiro já possui anticorpos. O “*antigenic drift*” pode ocorrer tanto em vírus da Influenza do tipo A quanto do tipo B (Dowdle *et al.*, 1974; Kilbourne, 1975; Webster *et al.*, 1975; Stuart-Harris, 1979).

O outro mecanismo é o “*antigenic shift*” que ocorre apenas nos vírus da Influenza do tipo A, e resulta em drásticas mudanças antigênicas devido a um rearranjo gênico. O genoma segmentado do vírus possibilita que o mesmo adquira segmentos de um vírus da Influenza de outro subtipo (Dowdle *et al.*, 1974; Kilbourne, 1975; Webster *et al.*, 1975; Stuart-Harris, 1979), este rearranjo pode ocorrer em células infectadas com diferentes vírus animais e humanos, e o vírus resultante deste processo, pode codificar para proteínas antigênicas completamente novas, das quais humanos não possuem imunidade prévia. Sendo assim, a Influenza pandêmica surge quando um *antigenic shift* gera um vírus do qual a população humana é *naïve*. Um exemplo recente de pandemia ocasionada por “*antigenic shift*” foi a que ocorreu em 2009 com o vírus H1N1, que surgiu de uma combinação de genes de origem humana, aviária e suína. Atualmente, o antígeno contra a cepa H1N1 está contido na vacina sazonal. Os vírus influenza estão em constantes mudanças por meio de “*antigenic drift*”, já os “*antigenic shift*” ocorrem apenas ocasionalmente (Figura 1).

Figura 1. “Antigenic Drift” e “Antigenic Shift”

Esquema “Antigenic Drift” e “Antigenic Shift”. “Antigenic drift” gera vírus da influenza com pequenas modificações nos seus antígenos, enquanto o “antigenic shift” resulta em vírus com antígenos novos (mostrado em verde). Fonte: da autora

Em 2013 uma cepa potencialmente mortal de influenza a A/H7N9, resultado de um “antigenic shift”, emergiu na China contaminando indivíduos que foram expostos a aves domésticas. Desde o seu surgimento, poucos casos foram relatados fora da China, entretanto todas essas infecções ocorreram em indivíduos que antes de adoecerem viajaram a China (CDC, 2018) Usualmente, os vírus aviários de influenza causam infecções assintomáticas em humanos, entretanto o vírus de H7N9 é altamente patogênico em humanos enquanto que é praticamente assintomático em aves (To *et al.*, 2013). Foram relatados vários casos de pneumonia severa associada a H7N9, sendo que 33% dos indivíduos infectados foram hospitalizados resultando numa taxa de mortalidade de 67% (Gao *et al.*, 2013). No inverno daquele mesmo ano, uma segunda onda de infecções ocorreu, causando 165 mortes (Who, 2014).

Foi observado em um estudo, que uma cepa aviária de H7N9 foi capaz de infectar camundongos BALB/c sem prévia adaptação a outros hospedeiros, causando pneumonia severa e taxa de mortalidade de 82% (Li *et al.*, 2014). Também foi relatado em outros estudos, que tanto a infecção por H5N1 (De Jong *et al.*, 2006), como por H7N9 (Huang *et al.*, 2014) causaram produção descontrolada de mediadores inflamatórios, tais como citocinas (evento conhecido como *cytokine storm*), o que pode ser o foco da patogênese já que pôde ser correlacionado com o aumento da carga viral. Este microambiente altamente inflamatório causado por infecções, pode causar dano tecidual e propiciar infecções secundárias, através da entrada de bactérias como *Streptococcus pneumoniae* (Braciale *et al.*, 2012) por esta razão que as complicações por pneumonia relacionadas à infecção por influenza são tão comuns.

O H7N9 tem gerado preocupação à Organização Mundial de Saúde por ser antigenicamente distinto dos vírus sazonais em circulação e pelas infecções secundárias recorrentes que podem acometer, principalmente, a população infantil e idosa. Além disso, como na literatura não há casos reportados de infecção por H7N9 antes de 2013, possivelmente a maioria da população é *naïve* (suscetível) ao vírus e sua propagação torna-se uma preocupação para os órgãos de saúde pública.

Análises genéticas realizadas com H7N9 inicialmente mostraram que o surgimento de tal cepa foi resultado de um reagrupamento gênico de outros três vírus ancestrais. Porém, mais recentemente, análises evolutivas indicaram que na verdade vários eventos de reagrupamento gênico ocorreram e o último deles resultou em duas mutações importantes em termos de adaptação do vírus H7N9. Essas mutações são denominadas substituições do tipo Q226L e E627K, e foram relacionadas com adaptações do vírus à infecção do epitélio respiratório humano e disseminação em furões, respectivamente (Uyeki e Cox, 2013).

O vírus H7N9, apesar de altamente patogênico em humanos, não é transmissível entre estes indivíduos, sua forma de transmissão é entre aves e os humanos. Sendo um vírus Influenza do tipo A, assume-se que apresenta altas taxas de mutação e assim esse quadro atual poderá mudar. Neste caso, seria necessário que a produção rápida da vacina contra H7N9 esteja preparada em caso de um surto.

1.2 Epidemiologia

Segundo a OMS, as epidemias anuais do vírus Influenza resultam em 1 bilhão de casos no mundo (5 a 10% dos adultos e 20 a 30% das crianças), ocasionando de 3 à 5 milhões de casos graves e aproximadamente 250.000 à 500.000 mortes (Who, 2014). No ano de 2017 o tipo de Influenza mais reportado à OMS foi o A e houve um aumento dos casos do subtipo H3 no mesmo ano, além disso é possível observar mudança na prevalência dos subtipos no decorrer das semanas, entre 2016 e 2018 (Figura 2).

Figura 2. Circulação global de vírus da Influenza

Número de casos positivos para influenza por subtipo no mundo reportados para a OMS durante o ano de 2017. Fonte: (Who, 2018).

No Brasil, a Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis monitora os dados epidemiológicos da influenza também semanalmente. As informações apresentadas na figura 3 são referentes às semanas de 1 a 52 do ano de 2017, quando foram coletadas 21.415 amostras de indivíduos com Síndrome Gripal, das quais 27,2% tiveram resultado positivo para vírus respiratórios (60,4% foram positivos para influenza). Dentre as amostras positivas para influenza, 15 (0,5%) foram decorrentes de influenza A (H1N1) pdm09, 1.127 (37,9%) de influenza B, 61 (2,0%) de influenza A não subtipado e 1.770 (59,5%) de influenza A(H3N2) (Secretaria De Vigilância Em Saúde, 2017).

O objetivo da monitoração é identificar o comportamento da influenza no país, para orientação na tomada de decisão em situações que requeiram novos posicionamentos do Ministério da Saúde e Secretarias de Saúde Estaduais e Municipais, como a antecipação da campanha de vacinação.

Figura 3 Distribuição dos vírus respiratórios no Brasil em 2017

Distribuição dos vírus respiratórios identificados nas unidades sentinelas de Síndrome Gripal, por semana epidemiológica de início dos sintomas, Brasil, 2018, até a SE 52. Fonte: (Secretaria De Vigilância Em Saúde, 2017).

No decorrer do ano de 2017 houve uma mudança de predomínio da cepa que mais afetou a população brasileira. A cepa do tipo A/H3N2 foi responsável por 59,5% dos casos dentre as amostras positivas para Influenza, porém a partir da semana 28 houve um aumento no número de casos da cepa B. Devido à alta incidência das cepas H1N1, H3N2 e B, como pode ser visto nas Figuras 2 e 3, estas estão contidas na VSI.

Em relação à cepa da Influenza H7N9, de outubro de 2016 a junho de 2017 ocorreu a quinta e maior onda de infecções por este vírus na China, foram 739 casos sendo 206 fatais (Who, 2017). A figura 4 representa o número de casos confirmados no mundo de H7N9 (em azul) e as mortes decorrentes desta infecção (vermelho) desde março de 2013 até junho de 2017, no total foram 1580 casos confirmados e 609 mortes.

Figura 4 Número de casos humanos confirmados de H7N9 reportados pela OMS

Número de casos humanos confirmados de H7N9 reportados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) por semana desde o aparecimento do primeiro caso em 2013 até 12 de junho de 2017. Fonte: (Who, 2017)

1.3 Resposta Imune ao vírus Influenza

Na infecção pela influenza, o vírus entra no organismo do hospedeiro através das mucosas do trato respiratório ou dos olhos e dissemina-se para a corrente sanguínea. O vírus se replica através da maquinaria das células do hospedeiro e o sistema imune do infectado captura fragmentos de proteínas virais, os chamados antígenos, e produz anticorpos contra estes (Wiley e Skehel, 1987).

A HA, como comentado anteriormente, se liga ao ácido siálico da célula do hospedeiro, com esta ligação o vírus é internalizado e devido a proteína viral de superfície M2, que acidifica o pH, há a liberação do material genético viral (Weis *et al.*, 1988; Kawai e Akira, 2010). A proteína viral NP (nucleoproteína) ao estar no interior da célula liga-se ao RNA viral e as polimerases virais formando os RNPs (ribonucleoproteínas) resultando na internalização do genoma viral no núcleo celular. Dentro do núcleo as polimerases virais são responsáveis pela transcrição e replicação do genoma viral e assim novas moléculas de proteínas e RNA virais começam a ser produzidos com o auxílio da maquinaria celular do hospedeiro, formando partículas virais para infectar novas células (Sauter *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1995; Takemoto *et al.*, 1996).

Os PAMPs (do inglês *Pathogen-Associated Molecular Pattern*), ou padrões moleculares associados a patógenos, são reconhecidos pelas células do sistema imune inato

como sinal de entrada de agentes patogênicos pelos PRRs (do inglês *Pattern-Recognition Receptors*) das células apresentadoras de antígenos (APCs) (Medzhitov, 2007). Os PRRs podem ser TLRs (do inglês *Toll Like Receptors*), RIG-1 (do inglês *Retinoic Acid gene-I*) ou receptores do tipo NOD (do inglês *nucleotide-binding oligomerization domain*) (Pang e Iwasaki, 2011).

Os receptores do tipo Toll, ou TLRs, são proteínas que em sua maioria estão localizadas na membrana plasmática, sendo que TLR3, TLR7, TLR9 são exceções que estão localizados no compartimento endossomal (Nishiya e Defranco, 2004). Esses receptores estão presentes nas células do hospedeiro e são responsáveis pelo reconhecimento de determinados PAMPs, gerando sinais, que levam à produção de citocinas pró-inflamatórias essenciais para a ativação da resposta imune inata (Kawai e Akira, 2010). Treze TLRs já foram identificados entre seres humanos e roedores, humanos expressam funcionalmente de TLR1 a TLR10, enquanto roedores expressam de TLR1 a TLR9 e de TLR11 a TLR13 (Lacagnina *et al.*, 2017). Alguns dos ligantes mais conhecidos são: PAMPs de bactérias Gram-positivas para TLR2, RNA de cadeia dupla derivado de vírus para TLR3, lipopolissacarídeo (LPS) para TLR4, flagelina bacteriana sendo ligante de TLR5 (Hayashi *et al.*, 2001); RNA de cadeia simples para TLR7, entre outros.

O RNA do vírus da influenza é um PAMP que se une ao TLR7 das células do hospedeiro resultando na produção de citocinas, quimiocinas e interferons do tipo I (IFN 1) pelas células epiteliais infectadas e pelas APCs (Alexopoulou *et al.*, 2001; Lund *et al.*, 2004). Os interferons do tipo I possuem uma resposta antiviral importante, pois, inibem a síntese de proteínas virais nas células infectadas do hospedeiro, impedindo a replicação viral (Oh e Eichelberger, 2000).

A infecção por Influenza também resulta na ativação do complexo citoplasmático inflamassoma NLRP3 (do inglês *nucleotide-binding domain and leucine rich repeat containing receptor*). A ativação dessa via ativa a Caspase-1 que leva à maturação da IL-1 β , uma citocina relacionada com a ativação da resposta Th17 e expansão de células TCD4 (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007; Ichinohe *et al.*, 2010). Além disso, NLRP3 e Caspase-1 foram essenciais na proteção de camundongos contra a infecção por H1N1 (Allen *et al.*, 2009; Tate *et al.*, 2016).

As células dendríticas (DCs) fazem parte da primeira linha de defesa da imunidade inata, elas se originam na medula óssea a partir de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes (Akashi *et al.*, 2000). Estas células dão origem a duas linhagens de DCs: mielóides e plasmocitóides (Banchereau *et al.*, 2000). As DCs mielóides, ou convencionais, estão

distribuídas em locais onde ocorre o primeiro encontro do antígeno com células envolvidas na resposta imune, como pele, mucosas, interstício de órgãos e etc (Rossi e Young, 2005).

As células dendríticas plasmocitóides (pDCs) possuem morfologia similar à de plasmócitos produtores de anticorpos e são consideradas como as principais células da imunidade antiviral, pois são capazes de produzir IFN do tipo I que, indiretamente, impede a replicação do vírus na célula infectada (Gilliet *et al.*, 2008) e apresentam os antígenos para células T (Villadangos e Young, 2008).

Além das DCs, os macrófagos exercem um importante papel na imunidade, sendo uma das primeiras populações celulares a entrarem em contato com o antígeno. Após a infecção por influenza, os macrófagos são ativados e fagocitam ativamente células infectadas, limitando assim a disseminação viral. Dependendo do microambiente onde se localizam e do estímulo que sofrem, estes pertencem a categorias diferentes.

Os macrófagos M1 diferenciam-se em resposta ao estímulo por GM-CSF e IFN γ ou outros agentes pró-inflamatórios tais como o fator de necrose tumoral- α (TNF α) e o Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (Van Furth *et al.*, 1972). Estas células M1 expressam níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias tais como o TNF α , IL-1 β , IL-12, IL-18, IL-6, IL-12, IL-1 β , e assim os macrófagos adquirem a capacidade de eliminar agentes patógenos intracelulares, estando, portanto, relacionados com uma resposta imunidade adaptativa mediada por células (Th1) (Mackaness, 1962) (Fleetwood *et al.*, 2007; Cassol *et al.*, 2009; Cassetta *et al.*, 2011). Em um ambiente com a produção de citocinas como IL-10, em resposta a citocinas Th-2 como IL-4 e IL-13, os macrófagos se diferenciam à M2, e estes estão relacionados com resposta humoral, alérgica ou antiparasitária (Martinez *et al.*, 2009) apesar de estarem sendo descritos em outros contextos imunológicos.

A proteção à influenza é eficaz quando há produção de anticorpos contra as proteínas virais HA e NA, por estas serem as glicoproteínas de membrana mais abundantes (Gerhard, 2001; Subbarao e Joseph, 2007). O papel primário dos linfócitos T CD4 $^{+}$ é fornecer auxílio para a ativação das células T CD8 $^{+}$ e expansão clonal dos linfócitos B para produção de anticorpos específicos (Castellino e Germain, 2006). Além disso, há estudos que sugerem que as células T CD4 $^{+}$ específicas contra Influenza aceleram a resolução da infecção por meio de funções efetoras diretas, mediadas pela produção de IFN- γ , perforina e a ativação da resposta inata em tecidos infectados (Brown *et al.*, 2006; Doherty *et al.*, 2006; Strutt *et al.*, 2010).

A HA é o antígeno responsável que leva a produção dos principais anticorpos neutralizantes contra o vírus e, por isso, é o antígeno presente nas formulações vacinais. Os

anticorpos neutralizantes se ligam ao vírus e sinalizam ao sistema imune que destrua o antígeno, no caso da Influenza os anticorpos neutralizantes impedem que a HA se ligue ao ácido siálico bloqueando o sítio de reconhecimento e assim, a internalização e replicação do vírus (Skehel e Wiley, 2000).

A IgA (Imunoglobulina A) é secretada na mucosa do trato respiratório e é capaz de neutralizar o vírus, sendo a primeira linha de defesa do hospedeiro (Rothbarth *et al.*, 1999). Anticorpos do tipo IgM também são característicos da resposta contra influenza, e iniciam a ativação do sistema complemento, e que podem neutralizar precocemente a infecção (Jayasekera *et al.*, 2007). A IgG está presente na corrente sanguínea e tem o objetivo de neutralizar a ação do vírus, porém é produzida mais tardiamente. Estudos em modelos animais mostraram que tanto a IgG produzida quanto os plasmócitos podem perdurar anos após a infecção por Influenza (Murphy *et al.*, 1982). Cabe ressaltar que os anticorpos IgG possuem diferentes subclasses, entre elas IgG1 e IgG2a, que se destacam por serem induzidas pelas respostas dos tipos Th2 e Th1, respectivamente. A produção de anticorpos do tipo IgG2a estão envolvidos com de citocinas (IFN γ) de tipo Th1 (resposta celular) e a produção de IgG1 com as citocinas (IL10, IL4) do tipo Th2 (resposta humoral) (Finkelman *et al.*, 1990).

1.4 Vacinas fragmentadas e inativadas da Influenza

A vacinação é o modo mais eficaz de prevenção contra a Influenza e devido à capacidade de transmissão da infecção, a produção, distribuição e administração da vacina devem ser rápidas. A capacidade da Influenza de ser transmitida pelo ar auxilia na disseminação deste vírus, principalmente pela tendência mundial em se confinar em lugares fechados (pouca circulação de ar) devido ao aumento da população mundial e pelas viagens ao exterior que aumentam as probabilidades de circulação de um novo vírus em um espaço curto de tempo.

A OMS se reúne anualmente para determinar quais são as cepas de Influenza que vão compor a vacina sazonal, baseando-se nos vírus que estão em circulação eles determinam com base em amostras enviadas pelo mundo todo aos Centros de Referência em Influenza (Who, 2014).

O Instituto Butantan (IB) produz uma vacina sazonal de influenza (VSI) sem adjuvante, composta de 15 μ g de antígeno de cada um dos vírus A (H1N1, H3N2) e B, seguindo o relatório da OMS (Who, 2014). Esta vacina é fragmentada e inativada, sendo produzida utilizando a tecnologia de replicação viral baseada em ovos (Butantan). A produção do IB da vacina trivalente de influenza é destinada ao Sistema Único de Saúde (SUS) o qual tem, como

principais alvos de imunização, pessoas idosas, gestantes, crianças e pessoas com doenças crônicas, por serem grupos mais susceptíveis à influenza (Ministério da Saúde). A ampla cobertura vacinal é de suma importância já que a influenza sazonal é a principal causa de morte em idosos maiores de 65 anos, como mostrou um estudo realizado nos Estados Unidos (Gardner *et al.*, 2006). Sendo assim, o Ministério da Saúde promove uma campanha de vacinação nacional no Brasil, destinada aos grupos de risco citados (Ministério da Saúde).

A demanda anual mundial de vacinas contra influenza cresceu e continua crescendo. Em 2006 a demanda era de 500 milhões de doses e, no final de 2015, chegou a 2 bilhões (Who, 2014). A produção é um processo complicado e de alto custo, devido à possibilidade de reformulação anual da vacina, como citado acima, por isso, métodos que ajudassem a diminuir a quantidade de antígeno por dose, como o uso de adjuvantes, ajudariam a aumentar o número doses de vacinas disponíveis para a população.

O quadro atual de crescentes casos de H7N9 demanda que seja desenvolvida a mais eficiente e rápida estratégia de vacinação contra essa possível cepa pandêmica. O IB já produziu, em fase teste, a vacina contra H7N9 de vírus fragmentado e inativado na planta da VSI. A fabricação rápida de uma vacina apropriada deve ser uma prioridade para proteger a população de uma possível pandemia, mas também é necessário garantir que tal vacina seja altamente imunogênica. Esforços foram feitos para o desenvolvimento de vacinas contra subtipos de influenza H7, porém foram prejudicados pela baixa imunogenicidade desta HA (Couch *et al.*, 2012). Assim, vários pesquisadores e produtores de vacinas propõem o uso de adjuvantes à vacina H7N9, a fim de potencializar sua resposta imune.

1.5 Adjuvantes

A palavra adjuvante vem do latim “adjuvare” cujo significado é ajudar. Adjuvantes são substâncias que, quando adicionadas a vacinas, aumentam a eficiência da resposta imune (Lycke, 2010).

Os adjuvantes podem possibilitar o uso de menor quantidade de antígeno, propiciando o aumento de doses produzidas e a potencialização da resposta imune gerada pela vacina com a qual está sendo formulado. A potencialização pode estar relacionada com a liberação vagarosa do antígeno e o aumento da captação pelas APCs, propiciando o aumento de sua entrega aos linfócitos T para a ativação da resposta imune adaptativa (Lycke, 2010).

- Hidróxido de Alumínio (Al(OH)₃)

Os compostos de alumínio têm sido amplamente utilizados como adjuvantes de vacinas humanas há mais de 70 anos. Sabe-se que o efeito adjuvante está associado à indução de respostas Th2 que leva à produção de anticorpos (Brewer *et al.*, 1996; Brewer *et al.*, 1999), no entanto, os mecanismos de ação deste efeito não foram completamente elucidados. Acreditava-se que os adjuvantes de alumínio causavam a retenção do antígeno no local da injeção levando o antígeno ser liberado vagarosamente, proporcionando uma exposição prolongada as APCs (Lindblad, 1995; Morefield *et al.*, 2005), porém seu efeito adjuvante não foi observado quando o antígeno era administrado 24 horas após o adjuvante. A inflamação e danos celulares causados por sais de alumínio demonstraram ser sua atividade adjuvante. Foi demonstrado que o hidróxido de alumínio aumenta a absorção de antígeno pelas APCs (Mannhalter *et al.*, 1985), essa ação entretanto se mostra pouco eficiente em relação à resposta Th1 citotóxica pois não induz resposta de células T CD8+, o que não favorece o seu uso no caso das vacinas contra patógenos intracelulares (Mbow *et al.*, 2010).

Desde 2009 é utilizado nos Estados Unidos na vacina, Cerverix, juntamente com o MPLA de *Salmonella minnesota* contra o vírus do papiloma humano (HPV), os dois adjuvantes administrados em conjunto proporcionam uma resposta celular e humoral aos indivíduos que são imunizados com a vacina (Prevention, 2018). O hidróxido de alumínio como único adjuvante para vacinas da Influenza não apresentou aumento dos níveis de anticorpos neutralizantes específicos em comparação à formulação sem adjuvante (Quintilio *et al.*, 2009).

- Monofosforil Lipídio A de *B. pertussis* (MPLA)

O monofosforil lipídio A (MPLA) é um produto atenuado do lipopolissacarídeo (LPS) que é um potente, porém tóxico (Rietschel *et al.*, 1994), indutor de resposta imune encontrado como constituinte majoritário da parede de bactérias gram negativas (Khoruts *et al.*, 1998).

O MPLA é um ligante do TLR4 já que é um derivado do LPS, este é capaz de ativar as cascatas de sinalização mediadas por MYD88-TIRAP e TRIF-TRAM, levando a produção de citocinas próinflamatórias (Mata-Haro *et al.*, 2007), no entanto, o MPLA de *Salmonella minnesota* induz majoritariamente a via TRIF-TRAM, o que lhe confere propriedades de baixa toxicidade.

O MPLA utilizado neste trabalho é retirado do LPS de *B. pertussis* e foi produzido

pelo IB, este potencial adjuvante é um subproduto da produção da vacina WPlow e devido ser o aproveitamento de um rejeito seu custo é baixo. Se o MPLA de *B. pertussis* possuísse as mesmas propriedades que o de *S. minnesota*, este complementaria a resposta imune do hidróxido de alumínio com uma resposta Th1, como realizado para a vacina contra HPV.

A atividade adjuvante do MPLA do LPS de *B. pertussis* já foi observada juntamente com hidróxido de alumínio com a vacina monovalente da Influenza H1N1, devido a isso, acreditamos que a combinação dos dois adjuvantes seja uma alternativa para ser utilizada juntamente a VSI.

- Flagelina

Flagelinas são as proteínas mais abundantes que compõe o filamento do flagelo bacteriano. O flagelo funciona como um propulsor mecânico que confere mobilidade à bactéria e também proporciona a adesão e invasão à células hospedeiras (Ramos *et al.*, 2004).

As flagelinas são encontradas nas enterobactérias móveis e podem também ser denominadas de antígenos H. A *Salmonella enterica* sorovar Thyphimurium pode expressar dois antígenos H diferentes, flagelinas H1 e H2 que são codificadas, respectivamente, pelos genes *fliC* e *fljB*, localizados em posições diferentes do cromossomo bacteriano. A expressão desses genes é coordenada de modo que somente um antígeno flagelar é expresso num dado momento, na célula bacteriana (Bonifield e Hughes, 2003).

As flagelinas são potentes indutores da resposta imune inata e por isso são reconhecidas como adjuvantes vacinais, já que são ligantes do receptor TLR5 (Hayashi *et al.*, 2001). A ligação da flagelina de *S. Typhimurium* ao TLR5 exige a despolimerização dos flagelos em monômeros (Smith *et al.*, 2003). Um estudo revelou a ativação e expansão de células T CD4+ específicas em animais imunizados com antígeno OVA na presença de Flagelina (Mcsorley *et al.*, 2002), sugerindo a atividade adjuvante da Flagelina.

Com o objetivo de prever assinaturas moleculares relacionadas com a resposta imune inata induzida pela VSI, usando a Biologia dos Sistemas, foram utilizadas amostras de PBMCs (do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) de voluntários humanos imunizados e seus resultados mostraram que três dias após a vacinação, com VSI, houve um aumento na expressão do gene de TLR5 que foi correlacionada com o aumento da produção de anticorpos específicos, medidos quase um mês após da imunização (Oh *et al.*, 2014). Em seminário apresentado no IB, o co-autor deste trabalho mencionou que este resultado causou dúvida de se a vacina estaria contaminada com alguma bactéria, já que o vírus não é ligante de TLR5. Foi

então que os autores mostraram que a sinalização da flagelina por TLR5 nas APCs e nas células B, promove a diferenciação e sobrevivência de plasmócitos frente à imunização com VSI. Quando realizaram ensaios em animais imunizados com VSI comprovaram que a sinalização via TLR5 envolvia a flagelina de bactérias residentes na microbiota intestinal, e que levava à potencialização da resposta imune induzida pela vacinação (Oh *et al.*, 2014).

Algumas das vacinas as quais se utilizou a flagelina como um eficiente adjuvante foram: contra a *Yersinia pestis* (Honko *et al.*, 2006); Influenza, como H1N1 (Skountzou *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2017); *Mycobacterium tuberculosis* (Le Moigne *et al.*, 2008) e *Plasmodium vivax* (Bargieri *et al.*, 2008). Devido a sua atividade, como adjuvante, estar reportada com diferentes vacinas, a Flagelina poderia ser um potente adjuvante para a VSI e a vacina monovalente de H7N9.

- Emulsão de óleo em água

Um adjuvante conhecido por ser um dos mais potentes por induzir anticorpos quando administrado com a vacina de influenza, é uma emulsão de óleo (esqualeno) em água que é encontrada naturalmente em muitas plantas e animais (incluindo humanos) e sua composição é C₃₀H₅₀ (Ott *et al.*, 1995; Vesikari *et al.*, 2009). O nome comercial do adjuvante licenciado é MF59®, da empresa Novartis, neste estudo foi utilizada a emulsão de óleo em água comercial da Invivogen, o Addavax®, que possui formulação similar ao MF59®.

O mecanismo de ação mais conhecido do MF59® é a ativação de DCs e macrófagos residentes no sítio de injeção da vacina, os quais respondem induzindo a produção de quimiocinas, resultando na migração de várias subpopulações celulares ao sítio de injeção (Mosca *et al.*, 2008). Dentre as células recrutadas estão os monócitos e granulócitos que são estimulados ao entrar em contato com o MF59®, amplificando o influxo de fagócitos (Seubert *et al.*, 2008). Este microambiente gerado pelo adjuvante, com grande quantidade de células ativadas, proporciona um transporte mais eficiente de antígenos para os linfonodos drenantes (O'hagan *et al.*, 2013). Além disso, o adjuvante induz a diferenciação de monócitos em DCs (Seubert *et al.*, 2008) e promove a captação do antígeno por essas células ocasionando o aumento dos títulos de anticorpos neutralizantes (Tritto *et al.*, 2009).

A emulsão de óleo em água também executa sua atividade adjuvante através da liberação de ATP do músculo, no qual ele é administrado (Vono *et al.*, 2013), propiciando o aumento da imunidade através de uma via independente de TLR e do Inflamassoma NLRP3 mas que requer a proteína adaptadora MyD88 (Seubert *et al.*, 2011). Um grupo de

pesquisadores comprovou tal fato, pois imunizaram animais knockout para MyD88 com um antígeno (*Neisseria meningitidis*) e a emulsão de óleo em água, e os animais MyD88^{-/-} apresentaram uma diminuição do título de anticorpos totais de IgG quando comparados a animais selvagens (Seubert *et al.*, 2011). Apesar de sua ação ser dependente dessa proteína adaptadora, o MF59[®] não foi capaz de ativar TLRs *in vitro*, portanto é através de outro receptor ainda desconhecido, que há ativação de MyD88.

O uso do MF59[®] como adjuvante de VSI já se mostrou eficaz, pois promove o aumento de anticorpos neutralizantes do indivíduo imunizado, além disso, é um adjuvante licenciado em algumas partes do mundo, como Europa e Estados Unidos e por esse motivo é amplamente estudado (CDC, 2018).

Em um ensaio clínico foi observado que o uso do MF59[®], com a vacina de H7N9 de vírus inativado e fragmentado, potencializou a resposta imune de indivíduos que receberam duas doses da formulação contendo 3,75µg de HA e este adjuvante (Mulligan *et al.*, 2014; Jackson *et al.*, 2015). Em outro estudo que usou o MF59[®] como adjuvante da vacina contra H5N1, foi relato que o MF59[®] foi essencial para a indução de células B de memória específicas e de anticorpos neutralizantes, e também para o aumento de células TCD4⁺ ativadas e produtoras de IL-2+IFN γ IL-13 (Galli *et al.*, 2009)

Este adjuvante, apesar de ainda não ter sido aprovado no Brasil, está em início de produção no IB. A caracterização da resposta Imune a diferentes vacinas de Influenza, formuladas com um adjuvante que está sendo produzido, ambos em nossa instituição, é essencial para fundamentar testes da potencialização da resposta imune, segurança e também sustentar evidências para aprovação da ANVISA para uso em humanos. Além disso os mecanismos de ação deste adjuvante não foram completamente elucidados.

2. Objetivos

Caracterização da resposta imunológica induzida pela administração das vacinas da Influenza sazonal e H7N9, produzidas no IB, com diferentes adjuvantes o MPLA de *B. pertussis* com Hidróxido de alumínio, o Addavax[®] e a Flagelina de *S. Typhimurium*.

2.1 Objetivos Específicos

- Determinação da concentração de anticorpos específicos séricos contra a VSI e H7N9 através de ELISA e também de anticorpos neutralizantes através do Ensaio de Inibição da

Hemaglutinação (HI).

- Imunofenotipagem das populações celulares envolvidas na resposta imune inata e adquirida de animais imunizados através de citometria de fluxo.
- Avaliação do perfil das citocinas e quimiocinas envolvidas na resposta imune da vacina VSI formulada com emulsão de óleo em água

3. Materiais e Métodos

3.1 Desenhos Experimentais

A estratégia de imunização utilizada foi a de dose única ou de duas doses, dependendo do caso, como será explicado. O sangue e os tecidos foram coletados em seus respectivos pontos experimentais, dependendo do objetivo do experimento que estava sendo realizado. Na figura 5 é possível observar como essas variáveis estavam dispostas ao longo do tempo.

Figura 5 Desenho Experimental geral dos experimentos realizados

3.2 Animais

Foram utilizados animais fêmeas da linhagem BALB/c, com idade de 6-8 semanas e 18-20g, adquiridos no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Cada grupo experimental contou com aproximadamente cinco animais.

O trabalho foi desenvolvido de acordo com os preceitos da lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do decreto 6.899 de 15 de julho de 2009 e de normas complementares. Obedeceu também aos princípios éticos na experimentação animal adotado pelo colégio brasileiro de experimentação animal (COBEA) e obteve a aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal do IB (CEUAIB) sob os protocolos de números 1282/14 e 5315200116.

3.3 Antígenos

Foram utilizados antígenos monovalentes da Influenza do tipo A e B. Todas as vacinas foram produzidas no IB em ovos, sendo fragmentadas (Triton X-100) e inativadas (formaldeído) (Tabela 1). A proteína do vírus que a vacina contém é a que foi utilizada na imunização da população alvo do Brasil em 2015 e 2016.

Tabela 1 Antígenos monovalentes utilizados na imunização de camundongos

<i>CEPA</i>	<i>LOTE</i>	<i>TEOR de HA (µg/ml)</i>
H1N1 cepa A/California/7/2009	IB-InH1/PC 0055/2013	213,12
H3N2 cepa A/Texas/50/2012	IB-InH3/PC 0045/13/01	152,82
H7N9 cepa A/Shangai/2/2013	RG32A.3 (lote piloto)	150,57
H7N9 cepa A/Shangai/2/2013	H7/CG160002/2	171,13
B cepa B/Massachusetts/2/2012	IB-InB/PC 0048/14/01	135,96

Identificação dos antígenos monovalentes utilizados na imunização de camundongos durante este projeto, dados fornecidos pelo Laboratório de Influenza da Divisão de Produção e Desenvolvimento Tecnológico do IB.

A VSI foi formulada um dia antes da imunização de cada experimento com as cepas H1N1, H3N2 e B. No experimento para a realização de uma curva dose resposta da VSI foram utilizadas diferentes doses, os valores a seguir correspondem à quantidade de HA de cada cepa: Dose I – 1,1µg; Dose II – 0,36µg; Dose III – 0,12µg e Dose IV – 0,04µg.

A quantidade de HA de cada cepa contida na principal dose teste da VSI foi de 0,4µg, totalizando 1,2µg de antígeno. A dose de 3,75µg de cada HA foi utilizada como controle positivo das imunizações. Quando a vacina foi administrada por via subcutânea (SC) foram utilizados 200ul de volume final da vacina, sendo 100ul em cada lado na região anterolateral. Pela via intramuscular (IM) foram administrados 50ul de volume final da vacina que foram injetados no músculo adutor longo de uma das patas traseiras do animal. A solução tampão utilizada para obtenção do volume final desejado foi o PBS estéril. Quando realizada duas imunizações, a 2ª foi 21 dias após a primeira

3.4 MPLA de *Bordetella pertussis* e Hidróxido de Alumínio

Estes adjuvantes foram cedidos pelo setor de produção do IB e foram utilizados 5µg de MPLA e 7,52µl de hidróxido de alumínio por dose.

3.5. Emulsão de óleo em água (Addavax®)

Foi utilizado como adjuvante a versão comercial da InvivoGen® denominado Addavax® que possui uma formulação similar ao MF59® (Invivogen, 2017). O Addavax® é feito pela nano-emulsificação de 2 componentes: o Trioleato de sorbitano (0,5% m/v) em óleo de esqualeno (5% v/v) e o Tween 80 (0,5% m/v) em tampão de citrato de sódio (10 mM, pH 6,5) (Invivogen, 2017).

Na formulação da vacina com o AddaVax® foi feita uma diluição 1:1 em relação ao volume do antígeno vacinal.

3.6. Flagelina de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

A obtenção da flagelina foi realizada segundo protocolo descrito por (Braga *et al.*, 2008) a partir da estirpe de *Salmonella entérica* sorovar thyphimurium SL3261. O adjuvante foi obtido e cedido gentilmente pelo grupo do Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira (Departamento de Microbiologia, ICB-USP) e foram utilizados 10µg por animal.

3.6.1. Remoção excesso de lipopolissacarídeo (LPS)

A flagelina foi tratada com Triton X-114 para remoção do excesso de LPS (Aida e Pabst, 1990). Foram adicionados 10 µL de Triton X-114 em 1 mL das preparações de flagelina e, em seguida, as soluções foram vortexadas e incubadas em gelo por 5 minutos. As amostras foram novamente vortexadas e incubadas a 37°C por 5 minutos. Após centrifugação a 37°C por 30 segundos a 15.000 g, a fase aquosa foi coletada e o protocolo foi repetido por mais 4 vezes. A flagelina foi dosada pelo método de Bradford e estocada a -20°C até a imunização (Bradford, 1976).

3.6.2. Teste L.A.L. (do inglês *Limulus Amebocyte Lysate*)

Após o procedimento de remoção de excesso de LPS, a flagelina foi submetida ao teste L.A.L. para detecção e quantificação de endotoxinas (Levin e Bang, 1964). O teste LAL, na flagelina, foi realizado antes e depois do tratamento com o Triton X-114, e além do adjuvante foi quantificada a endotoxina da VSI.

Foi utilizado o kit da Lonza LAL QLC-1000™ Assay (Catalog number: 50-

647U,50-648U), todas as recomendações e instruções fornecidas pelo fabricante foram seguidas. As amostras foram misturadas com reagente LAL e reagente de substrato cromogênico durante uma incubação, a leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 405nm. O teste foi realizado no setor de vacinas aeróbicas do IB.

3.6.3. Funcionalidade Flagelina

As células HEK-Blue™ TLR5 (InvivoGen, San Diego, CA, EUA) foram projetadas para estudar a estimulação do TLR5 monitorando a ativação de NF- κ B e AP-1. Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

Essa linhagem celular é cotransfectada com os genes que codificam hTLR5 (humano) ou mTLR5 (camundongo) e o gene repórter para secreção de fosfatase alcalina embrionária fusionada ao fator de transcrição NF- κ B. Inicialmente as células foram descongeladas e ressuspensas ao seu respectivo Meio Selection. As células foram passadas em câmara de CO₂ 37°C, até atingirem uma confluência de 70-80%, após isto, foram retiradas com ajuda de PBS usando um raspador de células e ressuspensas em Meio de Detecção contendo o substrato (InvivoGen, San Diego, CA, EUA). As células foram expostas a diferentes concentrações de flagelina tratadas com Triton X-114, sendo incubadas em câmara de CO₂ 5%, 37°C durante 16 hrs. Após este tempo, a atividade de secreção de fosfatase alcalina foi medida por um espectrofotômetro com 605nm.

Foi utilizada como controle positivo, uma Flagelina de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium produzida em diferente laboratório (Laboratório de Bacteriologia 1, IB) e sem o tratamento de remoção de endotoxina. Como controle negativo, foram utilizados os meios que foram usados no decorrer do experimento e água apirogênica.

3.6.4. Preparação flagelina para formulação vacinal

Inicialmente, previamente à formulação das vacinas, a flagelina era aquecida a 65°C durante 30 minutos para promover a despolimerização do filamento flagelar após avaliação da melhor temperatura e tempo que resultasse em um melhor resultado foi escolhido o protocolo de 95 °C por 10 minutos. Para avaliação do melhor protocolo despolimerizante e despolimerização do adjuvante, a flagelina foi aplicada a um gel de poliacrilamida 15% e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 15%) com e sem o B-mercaptoethanol e diferentes protocolos de aquecimento.

Os grupos que foram imunizados com a flagelina receberam 10µg por animal desse composto conforme descrito por (Braga *et al.*, 2008)

3.7. *Sangrias*

Os animais foram anestesiados localmente com colírio (cloridrato de proximetacaína 0,5%) para serem sangrados por punção pelo plexo orbital, em que foram coletados 200 µl de sangue. O número de sangrias e sua finalidade foram variáveis de acordo com cada experimento.

3.7.1. Coleta de soro O sangue foi coletado em tubos de 1,5ml e incubado a 37°C durante 30 minutos após isso foi acondicionado a 4°C durante 16 horas. O material foi centrifugado a 2000rpm, 4°C, durante 10 minutos para a retirada de soro. Se necessário, era repetida a etapa de centrifugação para retirada da porção sérica. O soro foi coletado em novos tubos e armazenado a -80°C.

3.7.2. Coleta de PBMCs

O sangue de cada animal foi heparinizado e diluído com PBS (200:2:1000) e colocado em seu respectivo tubo cônico de plástico de 15 ml contendo 1000 µl de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich Co. LLC.). O material foi centrifugado a 400g por 3 minutos, sem aceleração e freio.

O botão de células foi recuperado e lavado, três vezes, com meio de cultura RPMI (Sigma-Aldrich Co. LLC.). As células isoladas foram contadas e sua viabilidade mensurada com o uso de uma câmara de Neubauer espelhada, para posterior análise das populações celulares circulantes por citometria de fluxo.

3.8. *Obtenção de tecidos e órgãos*

Após a eutanásia dos animais com 60 mg/kg de xilazina e 300 mg/kg de quetamina, foram retirados os linfonodos ou o tecido muscular (dependendo do desenho experimental) para posterior imunofenotipagem das populações celulares presentes nesses tecidos/órgãos por citometria de fluxo.

3.8.1. Linfonodos drenantes

Os linfonodos axiais e inguinais foram macerados com pistilo em meio de cultura RPMI (Sigma-Aldrich Co. LLC.) em um tubo de 1,5ml. As células foram lavadas e as células viáveis foram contadas com o uso de uma câmara de Neubauer.

Após isso, foi realizada a marcação com anticorpos conjugados para posterior análise por citometria de fluxo ou as células foram cultivadas para estimulação *in vitro*, com os antígenos, para avaliação das citocinas e quimiocinas secretadas através de Imunoensaio.

As células que foram cultivadas estavam com meio RPMI completo e estufa a 37°C e 5% CO₂, a estimulação *in vitro* ocorreu com 1µg/ml dos antígenos vacinais H1, H3 e B durante 72 horas. Após este período o sobrenadante foi coletado e congelado a -80°C para posterior quantificação das citocinas e quimiocinas secretadas.

3.8.2. Tecido Muscular

Os músculos adutores longos foram extraídos e colocados em tubos falcon de 15mls contendo HBSS (Sigma-Aldrich Co. LLC.) em gelo. Os músculos foram cortados em pequenos pedaços e digeridos com 0,05% de collagenase de tipo II (Gibco) em HBSS durante 30 min a 37°C sob agitação constante. A suspensão celular foi centrifugada, ressuspensa em DMEM (Gibco™) e filtrada através 70µm nylon (Falcon). Após isso, foi realizada a marcação com anticorpos conjugados para posterior análise por citometria de fluxo.

3.9. Imunofenotipagem por citometria de fluxo.

A imunofenotipagem das diferentes populações celulares foi feita por citometria de fluxo. Após a obtenção de células do sangue periférico, dos linfonodos e do músculo, a concentração celular foi ajustada e as células foram adicionadas às placas de fundo em U na quantidade de 1×10^6 céls/poço. Em seguida, as células foram ressuspensas em tampão para Citometria de Fluxo (tampão PBS suplementado com 2% de soro fetal bovino e 0,02% de azida sódica). As placas foram centrifugadas, os sobrenadantes foram descartados e os anticorpos conjugados a fluoróforos (1:100) foi adicionado. Após incubação, por 30 minutos em geladeira, as células foram lavadas, fixadas com Cytofix (BD Biosciences) e transferidas para tubos de leitura de citometria de fluxo onde após 12h foi adicionado tampão para citometria de fluxo

Os painéis de marcação variaram de acordo com os experimentos, foram realizadas as seguintes marcações:

Tabela 2 Marcadores utilizados na imunofenotipagem para definir determinadas populações celulares

<i>APCCy7</i>	<i>PECY7</i>	<i>PERCPCY5</i>	<i>APC</i>	<i>PE</i>	<i>FITC</i>	<i>BV421</i>	<i>BV510</i>
CD11b	CD11c	CD80	CD123	IaIe	CD86	CD4	FVS510
Ly6C	CD11c	CD80	CD206	IaIe	F480	CD11b	FVS510
	CD38	CD19	GL7	B220	CD138	CD4	FVS510
CD4	CD44		CD127	CD62L	CD25	CD8	FVS510
CD4	CD25	CD8	CD11c		F480	CD11b	FVS510
CD4	CD11c	CD11b	CD80	B220	IaIe	CD40	CD86
Ly6C	CD11c	CD11b	CD80	B220	IaIe	CD4	CD86
CD4	F480	CD80	CD206	IaIe	CD86	CD11b	CD11c
CD11b	CD11c	B220	CD80	IaIe	CD4	CD40	CD86
Ly6C	CD11c	B220	CD80	IaIe	CD11b	CD4	CD86
CD4	F480	CD80	CD206	IaIe	CD86	CD11b	CD11C
Ly6C	F480	CD11b	CD86	B220	CD4	CD40	CD11c
Ly6C	F480	CD11b	CD3	IaIe	L/D	Ly6G	CD11c
CD4	CD3	CD44	CD127	CD62L	CD25	CD8	FVS510
CD4	CD44	CD3	CD11a	CD8	CD62L	CD69	FVS510
LY6G	F480	CD11b	CD3	B220		L/D	CD11c

Esses marcadores foram utilizados associando, o melhor perfil das populações de interesse e os recursos disponíveis no laboratório. As populações que foram avaliadas foram as APCs e os linfócitos (Tabela 3).

Tabela 3 Perfil de expressão de marcadores de superfície das populações celulares para citometria de fluxo, continua

<i>População Celular</i>	<i>Fenótipos</i>
pDCs	CD11c+ LY6C+ B220+ CD4+ CD11b-
DCs Mielóides	CD11c+ CD11b+ IaIe+
Macrófagos Inflamatórios	CD11b+ F480+ Ly6C+ CD11c-
Macrófagos M2	CD206+ CD11b+ F480+
Monócitos Inflamatórios	CD11b ^{high} CD11c- LY6C ⁺⁺
Eosinófilos	LY6G ^{int} F480 ^{int}
Neutrófilos	Ly6g ⁺⁺ F480-
Linfócito T CD4 naive	CD3+ CD4+ CD44 ^{low}
Linfócito T CD4 Memória central	CD3+ CD4+ CD44 ^{high} CD62L ^{high}

Linfócito T CD4 Memória efetora	CD3+ CD4+ CD44 ^{high} CD62L ^{low}
Linfócito T Citotóxico CD8	CD3+ CD8+CD4-
Linfócito B	B220+ CD19+

Na maioria dos painéis de marcações realizados foram utilizados marcadores de viabilidade. Os marcadores de viabilidade são importantes, pois os anticorpos podem ligar-se inespecificamente as células mortas, gerando resultados falsos positivos.

Foram utilizados dois marcadores de viabilidade, o Live and Dead™ Green e o FVS510™ da BD Horizon™ que são corantes que reagem se ligando as aminas presentes nas células. As células mortas possuem a membrana permeável e, portanto, o corante se une as aminas internas da célula resultando em uma maior fluorescência das células, sendo assim, foi possível separar na análise (utilizando o software FlowJo) entre células vivas e mortas. Após essa separação na análise com o software, a imunofenotipagem das populações celulares foi realizada apenas no grupo das células vivas, ou seja, as que possuíam menor fluorescência do marcador de viabilidade.

A compensação do equipamento foi realizada com microesferas conjugadas a anticorpos (Becton-Dickison, San Jose, CA). Como controle de marcação no momento da análise foi utilizado controles FMO (do inglês *Fluorescence minus one*) que revelam a real positividade de um determinado marcador excluindo a interferência dos outros fluorocromos do painel.

As células marcadas foram analisadas em citômetro de fluxo FACS Canto II (Becton-Dickison, San Jose, CA). A expressão de marcadores específicos na superfície celular foi analisada utilizando o software FlowJo (Tree Star).

3.10 Ensaio de inibição da hemaglutinação (HI).

O HI foi realizado com o soro do sangue colhido na fase pré-imune e 21 dias após a imunização, para comparação e quantificação dos anticorpos neutralizantes específicos. Foi observada a titulação dos anticorpos neutralizantes específicas para cada cepa de Influenza separadamente.

3.10.1 Tratamento do soro com RDE

Após a obtenção do soro as amostras foram tratadas com a enzima destruidora de

receptor (RDE “*Seiken*”) para eliminar inibidores não específicos. Um volume de soro foi adicionado a quatro volumes de RDE e foram incubados a 37°C por 18 horas.

Transcorridas 18 horas, as amostras tratadas com RDE foram incubadas durante 30 minutos em banho úmido a 56°C para inativação dessa enzima. Após as amostras chegarem à temperatura ambiente, foi adicionado volume de PBS necessário para que o volume do soro original se encontrasse na diluição 1:10.

3.10.2 Determinação das unidades hemaglutinantes do antígeno/ titulação do antígeno (vacina)

Foi realizada diluição das vacinas monovalentes com PBS (1:10). Em uma placa de 96 poços com fundo em “U”, foi adicionado 50ul de vacina diluída e feita diluição seriada fator 2 com PBS. As amostras foram avaliadas em duplicata e a titulação foi feita de cada cepa separadamente. Após a diluição seriada foram adicionados 25ul de hemácias de cobaia a 1% (fornecidas gentilmente pelo Laboratório da Influenza do IB) em toda a placa. As placas foram incubadas por 1h a temperatura ambiente e a hemaglutinação foi observada como uma estrutura de rede que resulta em cor vermelha em todo o poço, o padrão pode ser observado na figura 6, linha B.

Figura 6 Componentes de um ensaio de inibição de hemaglutinação

	Componentes	Interação	Análise Resultado
A	hemácias		Sem Reação/Interação
B	Vírus/Antígeno + hemácias		Hemaglutinação
C	Vírus/Antígeno + Anticorpo neutralizante + hemácias		Inibição da Hemaglutinação

Princípio e interpretação de um HI, na linha A se observa a formação de um botão de hemácias devido a ausência de um antígeno; na linha B ocorre a hemaglutinação devido a ligação do antígeno com a hemácia formando uma “rede” destas células; na linha C há a formação de um botão de hemácias devido a presença de anticorpos neutralizantes que impedem a ligação do antígeno as hemácias por sua afinidade a esse antígeno, havendo, portanto, a inibição da hemaglutinação. Fonte: Centros para Controle e Prevenção de Doenças, modificado.

É considerada 1U (uma unidade) de antígeno a quantidade de antígeno necessária para aglutinar um volume igual de hemácias. Sendo assim, se o botão formou na diluição 1:80, por exemplo, foi considerado que a hemaglutinação ocorreu até o ponto 1:40. A partir deste exemplo, seria então considerado a diluição 1:40 como 1U de HA e então foi realizada uma diluição para o preparo de 8U (World Health Organization, 2002)

3.10.3. Inibição da hemaglutinação

A titulação dos anticorpos neutralizantes é analisada separadamente por cada cepa, o ensaio é realizado separando as cepas em sua respectiva placa.

As amostras de soro tratadas com RDE sofreram diluição seriada e 8U de antígeno de cada cepa foram adicionadas em cada poço e incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Após essa incubação foram adicionados 50 µl de hemácias de cobaia a 1% e, após 1 hora à temperatura ambiente, os títulos de plasma estavam prontos e os botões foram observados.

Os anticorpos neutralizantes específicos contra o antígeno inibem a hemaglutinação, impedindo que se forme a rede vermelha, devido a isso a inibição da hemaglutinação é vista por um botão de hemácias (Figura 6, linha C).

O título de inibição da hemaglutinação foi definido como a mais alta diluição em que o soro possuía a quantidade de anticorpos neutralizantes suficientes para inibir a hemaglutinação das hemácias.

3.11 Detecção de anticorpos por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Para verificar os níveis de anticorpos específicos séricos dos animais foi utilizado o método de ELISA. Foram utilizados anticorpos goat anti-mouse IgG total, IgG1 e IgG2a para detecção dos anticorpos. Como referência, foi utilizada curva padrão de IgG (Southern Biotech).

O procedimento consistiu em sensibilizar placas de 96 poços com 1µg/ml de cada HA diluídos em tampão carbonato-bicarbonato a 4°C durante 18 horas. Após esse período foram realizadas 3 lavagens da placa com 200 µl/poço com tampão PBS-T. Foi feito o bloqueio dos sítios reativos da placa com 100 µl/poço com leite em pó desnatado 10% em PBS-T a 37°C por 1 hora. Após nova lavagem, nas condições já citadas, foram adicionados 100 µl/poço do soro dos animais diluído em PBS-T 1% BSA. As placas foram incubadas durante 1h a 37°C e,

após lavagem, foram adicionados 100 µl/poço de anticorpos anti-IgG ou IgG1 ou IgG2a (Southern Biotech) de camundongos produzido em cabras, por mais 1h a 37°C. Após lavagens, adicionou-se um anticorpo produzido em coelhos anti- IgG de cabras conjugado a peroxidase (Southern Biotech), ao fim dessa etapa, foi realizada nova lavagem e acrescentados 100 µl/poço da solução substrato para revelação do ELISA seguida de incubação à temperatura ambiente durante cerca de 10 minutos.

A reação foi interrompida com 50 µl/poço de ácido sulfúrico 8N. e lidas em leitor de ELISA (Uniscience) a 492 nm. A determinação da concentração dos anticorpos foi realizada com base nas curvas de concentração aplicadas nas placas.

3.12. Imunoensaio para avaliação da secreção de citocinas e quimiocinas

A avaliação da secreção de citocinas e quimiocinas foi realizada nas amostras de soro e sobrenadante de cultura celular utilizando o Bio-plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex, Group I, seguindo as instruções do fabricante.

As amostras foram descongeladas no gelo e após isto centrifugadas a 14000g durante 10 min para sedimentação de possíveis debris. Foram adicionadas a cada poço da placa 50µl de microesferas magnéticas (beads) conjugadas a anticorpos anti citocinas e quimiocinas interleucina 2 (IL-2); interleucina 4 (IL-4); interleucina 5 (IL-5); interleucina 10 (IL-10); interleucina 12 (IL-12p70); *Granulocyte colony-stimulating factor* (GM-CSF); *Interferon gama* (IFN-γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), após isto foram realizadas duas lavagens.

As amostras foram adicionadas a seguir num volume de 50µl e incubadas a temperatura ambiente sob agitação de 850RPM durante 1 hora. Paralelamente, foram realizadas curvas padrão e controles máximos e mínimos com concentrações conhecidas dos analitos. Estas amostras também foram misturadas às beads e incubadas durante o mesmo tempo. Após a incubação a placa foi lavada três vezes e 25µl do anticorpo de detecção foi adicionado em cada poço, a incubação nesta etapa foi de 30 minutos, a temperatura ambiente e sob agitação de 850RPM.

A placa foi lavada 3 vezes e foi adicionado 50µl de streptavidina-PE com incubação de 10 minutos a temperatura ambiente e sob 850RPM de agitação. Foram adicionados 125µl de tampão (assay buffer) proveniente do kit para que as beads se ressuspendessem e a placa incubada durante 30 segundos com agitação de 850RPM. A leitura foi realizada em Magpix System. Os resultados foram expressos em concentração de citocinas presentes nas amostras, com base nas curvas padrão aplicadas no experimento.

3.13 Análises estatísticas

O teste estatístico usado para comparação de número de populações celulares/níveis de anticorpos entre os grupos foi o One-Way ANOVA., com pós-teste de Tukey. $P \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados com o programa Prism 5.0 (GraphPad Software inc., CA, EUA).

3.14 Soluções

- PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4.
- RPMI completo: 10% de soro fetal bovino inativado, 1% de glutamina, 1% de antibiótico e antimicótico
- Tampão de digestão: Colagenase do tipo II (1mg/ml), DNAase (150µg/ml), 2,5mM CaCl₂ em PBS

Hek Blue:

- Meio de cultura inicial para HEK-Blue™ hTLR5 e mTLR5 cells humano e 49urinho: DMEM, 10% soro fetal bovino, estreptomicina e penicilina (50µg/ml), normocina (100µg/ml) e L-glutamina 2Mm.
- Meio de cultura selection para HEK-Blue™ hTLR5 cells humano: DMEM, 10% soro fetal bovino, streptomicina e penicilina (50µg/ml), normocina (100µg/ml), L-glutamina 2Mm, zeocina (100µg/ml) e blasticidina (30µg/ml) e Selection 1x
- Meio de cultura selection para HEK-Blue™ mTLR5 cells 49urinho: DMEM, 10% soro fetal bovino, streptomicina e penicilina (50µg/ml), normocina (100µg/ml), L-glutamina 2Mm, zeocina (100µg/ml) e blasticidina (10µg/ml) e Selection 1x
- Meio de cultura detection para HEK-Blue™ hTLR5 e mTLR5 cells humano e 49urinho: um sachê para 50mls de água apirogênica, cada sachê contém tudo necessário para preparar 50 ml de meio para a detecção colorimétrica de fosfatase alcalina embrionária (SEAP)

SDS-page:

- Tampão de amostra para SDS-PAGE 5x: 250 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 10% (m/V), azul de bromofenol 0,5% (m/V), glicerol 50% (V/V) e 1M β-mercaptoetanol.
- Tampão Tris-glicina 5x: Tris base 1,5% (m/V), glicina 9,4% (m/V) e SDS 0,5% (m/V).
- Solução corante de SDS-PAGE: *comassie brilliant blue* 0,25% (m/V), etanol 40% (V/V) e

ácido acético 10% (V/V).

- Solução descorante de SDS-PAGE: etanol 30% (V/V) e ácido acético 10% (V/V).
- Solução secante de SDS-PAGE: etanol 50% (V/V) e ácido acético 10% (V/V).

ELISA:

- Tampão PBS-T/BSA 1%: PBS-T e 1% albumina bovina sérica.
- Tampão carbonato-bicarbonato: 50 mM Na₂CO₃ e 50 mM NaHCO₃, pH 9,6.
- Tampão citrato-fosfato: 100 mM citrato de sódio e 300 mM fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) pH 5,0.
- Solução substrato para revelação do ELISA: tampão citrato-fosfato pH 5,0, 0,04% de ortofenildiamina (Sigma) e 0,01% H₂O₂.

4. Resultados

Determinação e validação dos antígenos e adjuvantes utilizados no projeto.

4.1. Determinação das doses teste das vacinas da Influenza

Inicialmente foram realizados experimentos de imunização em modelos murinos com a VSI e MPLA de *B. pertussis* e hidróxido de alumínio. Nestes experimentos foi empregado como controle positivo a dose de 15µg de cada antígeno HA (formulação administrada em humanos) e como dose teste: 3,75µg de cada antígeno HA. Esta dose teste foi utilizada, pois seu uso foi reportado na literatura com vacinas monovalentes do IB (Quintilio *et al.*, 2009; Precioso *et al.*, 2011). Em nossos ensaios os animais imunizados com 15µg de HA e 3,75µg de HA produziram níveis semelhantes de anticorpos e, portanto, não havia necessidade de se propor o uso de adjuvantes com tais doses de vacina (Figura 7).

Figura 7 ELISA de altas doses da VSI

As amostras de soro foram coletadas 21 dias após a imunização, e os títulos de anticorpos IgG específicos contra a vacina trivalente da influenza (1µg/ml) foram medidos por ELISA em espectrofotômetro (492nm). As barras representam a média aritmética e o desvio padrão de cada grupo. One way anova, posteriori Tukey Test, n=5.

Essas doses representavam o efeito máximo da vacina e, assim, não era possível avaliar corretamente a ação de algum adjuvante com esta dose teste inicial. Por esta razão, foi realizada uma curva dose resposta com quatro diferentes doses da vacina em camundongos, a fim de encontrar uma nova dose teste adequada com mínima produção de anticorpos, que se pudesse observar a ação dos adjuvantes. As doses utilizadas foram: 1,1µg (de cada HA); 0,36µg (de cada HA); 0,12µg (de cada HA); 0,04µg (de cada HA).

A partir do soro, de 21 dias após imunização, foram realizados os ensaios de ELISA e HI para avaliação dos anticorpos específicos e neutralizantes, respectivamente. O ELISA de IgG específico para os antígenos contidos na vacina mostrou que, o grupo imunizado com a dose 0,36µg de HA apresentou uma produção de anticorpos até dez vezes maior que a dose 0,04µg de HA, sendo esse aumento significativamente estatístico (Figura 8). Entretanto, é possível observar que os únicos grupos que apresentaram aumento na produção de anticorpo contra a VSI, com diferença estatisticamente significativa, foram os grupos imunizados com duas doses de 3,75µg de HA (controle positivo) e com apenas uma dose de 0,36µg de HA, e esta diferença só foi observada quando comparada ao soro da pré-imunização e com a menor dose de 0,04ug (Figura 8).

Figura 8 ELISA da curva dose resposta dos antígenos da VSI

As amostras de soro foram coletadas 21 dias após a imunização, e os títulos de anticorpos IgG específicos contra a vacina trivalente da influenza (1µg/ml) foram medidos por ELISA em espectrofotômetro (492nm). O controle positivo do experimento foi o grupo imunizado com duas doses de 3,75µg da VSI. As barras representam a média aritmética de cada grupo e o desvio padrão. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, One way anova, posteriori Tukey Test, $n=5$.

Os resultados de HI são mostrados em *pool* (mistura de soro dos animais de cada grupo) pois, devido a problemas na técnica do ensaio, ocorreu perda de amostra não sendo possível realizar o HI com os animais individualmente. O grupo imunizado com 1,1µg de HA foi o que apresentou as menores concentrações de anticorpos neutralizantes, sempre em concentrações iguais ao soro antes da imunização (Figura 9).

Figura 9 HI da curva dose resposta dos antígenos da VSI

HI para detecção de anticorpos neutralizantes contra Influenza (H1N1, H3N2 e B) feito com pool de amostras de soro de animais imunizados com diferentes doses da VSI. **A B e C** mostram a titulação onde ocorreu a inibição da hemaglutinação do soro (pool, 5 animais) de 21 dias após a imunização contra cada cepa separadamente.

Diante de tais resultados, foi adotado 0,4µg de HA como dose teste pois, entre as doses testadas, foi a que apresentou uma produção detectável de anticorpos na qual acreditávamos que seria possível observar a ação de um adjuvante.

A curva dose resposta da vacina piloto contra H7N9 foi realizada por outros membros do laboratório de Bacteriologia 2 e o ensaio reportou que 3,75µg HA se mostrou a melhor dose para ser empregada na imunização de camundongos (Adami e Ho, não publicado). Um ensaio clínico utilizando a cepa H7N9 formulada com MF59[®] reforçou os achados de Adami, em que a dose de 3,75µg de HA com o adjuvante apresentou a maior taxa de soroconversão em humanos (21 dias da segunda imunização) (Mulligan *et al.*, 2014).

As doses testes que foram empregadas mediante essas informações foram de 0,4µg de HA de cada cepa da VSI e de 3,75µg da vacina monovalente contra H7N9.

4.2. Validação dos Adjuvantes por ensaios *in vitro*

Após definir as doses dos antígenos a serem utilizadas nos experimentos, iniciamos a validação por ensaios *in vitro* das diferentes propostas de adjuvantes que tínhamos: o MPLA, a Flagelina e o Addavax (emulsão de óleo em água).

4.2.1 MPLA do LPS de *B. pertussis*

Foi realizado um ensaio *in vitro* (Figura 10) com diferentes concentrações de MPLA (2,5; 5 e 10µg) estimulando células da linhagem HEK cotransfectada com os genes que codificam mTLR4 e o gene *reporter* para secreção de fosfatase alcalina embriônica fusionada ao NF-kB (Invivogen, 2017). Estas células nos permitem assim, detectar quando há ativação via TLR4, através da mudança de coloração do meio de cultura em que as células estão sendo cultivadas, já que o mesmo possui o substrato para a fosfatase alcalina produzida pela célula em resposta a indução de NF-kB.

Figura 10 Indução da sinalização da via TLR4 por MPLA de *B. pertussis* em linhagem celular HEK-Blue-mTLR4.

Ensaio *in vitro* de estímulo de via mTLR4/ NF-Kb, estímulo quantificado através da secreção de fosfatase alcalina por células HEK blue no sobrenadante da cultura celular. As células HEK-Blue mTLR4 foram estimuladas com várias concentrações de MPLA. O controle positivo é o LPS (100ng/ml), a leitura das placas foi feita em espectrofotômetro, O.D. 620nm. Os resultados representam media $\pm$ SE de 2 réplicas experimentais.

O adjuvante não foi capaz de induzir a ativação das células HEK Blue mTLR4, indicando que o adjuvante não ativa TLR4 pela via de MyD88 e também não possui endotoxinas (Figura 11).

4.2.2 Flagelina

A flagelina foi gentilmente cedida pelo Dr Luis Carlos de Souza Ferreira (Braga *et al.*, 2008) e tratada com Triton X-114 para remoção do excesso de lipopolissacarídeo (LPS) (Aida e Pabst, 1990). O procedimento de remoção de endotoxina por Triton X-114 já havia sido realizado pelo grupo do Dr Luis Carlos Ferreira, em trabalho que foi observado o efeito imunoterapêutico do adjuvante quando utilizado com uma proteína derivada de *Paracoccidioides brasiliensis*, tal formulação reduziu a metástase de pulmão em modelo murino de melanoma (De Melo *et al.*, 2015).

Após o procedimento de remoção de excesso de LPS, a flagelina foi submetida ao teste L.A.L. para detecção e quantificação de endotoxinas (Levin e Bang, 1964). O teste LAL, na flagelina, foi realizado antes e após o tratamento com o Triton X-114. Antes do procedimento, a concentração de endotoxina era de 11,27EU por micrograma de proteína, após o tratamento com o Triton X-114 a concentração diminuiu para 0,19EU/ μ g. A remoção de endotoxina mostrou-se eficaz e, sobretudo, atingiu níveis de endotoxina recomendáveis em vacinas (Tabela 4) (Brito e Singh, 2011).

Tabela 4. Teste L.A.L. da Flagelina

<i>Amostras</i>	<i>EU/ml</i>	<i>Concentração amostra μg/ml</i>	<i>EU/μg</i>
Vacina Trivalente Influenza	0,2416	37,5	0,006443
Flagelina apenas ressuspendida	338	30	11,26667
Flagelina I tratada com Triton	5,8819	30	0,196063
Flagelina II tratada com Triton	5,6844	30	0,18948

Resultados das amostras que foram testadas com o kit do Teste L.A.L. Flagelina I e II receberam nomes diferentes, pois foram tratadas com Triton X-114 em diferentes tubos, porém são provenientes da mesma solução mãe.

A ligação da flagelina de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ao TLR5 exige a despolimerização dos flagelos em monômeros (Smith *et al.*, 2003), devido a isto as amostras de flagelina foram analisadas por SDS-PAGE 12% para avaliar se o adjuvante se encontrava em forma de monômero no momento da administração da vacina.

Inicialmente foram realizados dois SDS-PAGE, o primeiro com a amostra tratada com β -mercaptoethanol e outra sem, devido ao β -mercaptoetanol ser um agente desnaturante. Os resultados mostraram que a flagelina não se encontra em sua totalidade em formato de monômero, pois com o uso do agente desnaturante, a mesma amostra apresentou uma maior concentração da banda de Flagelina, 51kDa (Uniprot) (Figura 11).

Figura 11 SDS-PAGE Flagelina

SDS-Page de flagelina antes do tratamento de Triton X-114 (canaleta 2 e 4) e flagelina depois do tratamento com Triton X-114 (canaleta 3 e 5). Amostras não tratadas (A) ou tratadas (B) com β -mercaptoetanol. A seta indica a banda referente ao monômero da Flagelina (aproximadamente 51 kDa) PM= padrão de peso molecular LMW em kDa (GE Healthcare).

Após estes resultados, para definir o melhor protocolo de aquecimento para despolimerização da flagelina, a amostra foi tratada em diferentes tempos e temperaturas, entretanto, no gel de acrilamida não foi possível observar diferença da despolimerização entre os diversos tratamentos (Figura 12).

Figura 12 Determinação do melhor protocolo de aquecimento da Flagelina

SDS-Page de flagelina tratada com Triton X-114 e diferentes protocolos de aquecimento. Caneleta 1: sem aquecimento; Caneleta 2: 65°C, 30 minutos; Caneleta 3: 95°C, 30 minutos; Caneleta 4: 95°C, 10 minutos; Caneleta 5: 95°C, 5 minutos. A seta indica a banda referente ao monômero da Flagelina (aproximadamente 51 kDa) PM= padrão de peso molecular LMW em kDa (GE Healthcare).

Foi realizado um ensaio para verificar a capacidade da flagelina em ativar a via de sinalização de TLR5, utilizando dois diferentes tratamentos de aquecimento: 65°C durante 30 minutos e aquecer a 95°C por 10 minutos. O receptor é expresso por células epiteliais e APCs, quando a flagelina se liga, há a indução de uma sinalização dependente de MyD88 que ativa o fator de transcrição pró- inflamatório NF- κ B, resultando em uma resposta imune inata (*in vivo*) e no caso das HekBlue mTLR5, na produção de fosfatase alcalina, similar a HekBlue mTLR4 que descrevemos anteriormente. O ensaio *in vitro* foi realizado com a linhagem celular HEK Blue expressando mTLR5.

A flagelina, induziu a ativação das células HEK Blue mTLR5 como mostra a figura abaixo (Figura 13), sendo o protocolo de aquecimento 95°C e 10 minutos o que mais induziu esta ativação.

Figura 13 Avaliação da funcionalidade da Flagelina

Ensaio *in vitro* de estímulo da via mTLR5/ NF- κ B, quantificado através da secreção de fosfatase alcalina por células HEK blue no sobrenadante de cultura celular. As células HEK-Blue mTLR5 foram estimuladas com Flagelina de diferentes protocolos de aquecimento indicados na figura e tratadas com Triton X-114. O controle positivo é uma flagelina produzida no Laboratório de Bacteriologia 1, a leitura das placas foi feita em espectrofotômetro, O.D. 620nm. Os resultados representam media $\pm$ SE de 2 réplicas experimentais.

Utilizando a mesma técnica para confirmação de que a remoção de endotoxina foi eficaz, foi realizado um ensaio com a linhagem celular HEK Blue expressando mTLR4. Os resultados demonstram que a remoção de endotoxina foi eficaz, pois além de atingir níveis recomendados para vacinas, quando comparado ao controle positivo, induziu minimamente a expressão de mTLR4 (Figura 14).

Figura 14 Confirmação da remoção de endotoxina da Flagelina através da linhagem celular Hek Blue expressando mTLR4

Ensaio *in vitro* de estímulo de vias (A) mTLR4/ NF- κ B, quantificado através da secreção de fosfatase

alcalina por células HEK blue no sobrenadante de cultura celular. As células HEK-Blue mTLR5 foram estimuladas com várias concentrações de Flagelina tratada com Triton X-114. O controle positivo é uma flagelina produzida no Laboratório de Bacteriologia 1, a leitura das placas foi feita em espectrofotômetro, O.D. 620nm. Os resultados representam media $\pm$ SE de 2 réplicas experimentais.

Em relação à despolimerização da flagelina apesar do SDS-page evidenciar que a flagelina não se encontra em sua totalidade em formato de monômero, foi possível, através do ensaio *in vitro* com a linhagem celular HEK Blue mTLR5, observar que há uma indução desta linhagem celular pela Flagelina, principalmente quando se utiliza o protocolo de aquecimento 95°C durante 10 minutos.

4.2.2. Emulsão de óleo em água (Addavax)

O adjuvante emulsão de óleo em água, utilizado neste trabalho, é um produto comercializado e fabricado pela Invivogen. A empresa garante sua esterilidade e seus níveis de endotoxina menores que <1EU/ml.

4.3 Escolha do Adjuvante mais eficaz para vacinas da Influenza

Após definirmos as doses dos antígenos a serem utilizadas nos experimentos *in vivo*, bem como a realização da funcionalidade dos adjuvantes *in vitro* e de dos níveis de endotoxina contidos nos mesmos, prosseguimos com os experimentos de imunização de camundongos com os adjuvantes já apresentados

4.3.1 MPLA do LPS de *B. pertussis* e Hidróxido de alumínio como adjuvantes para a VSI

Inicialmente os animais foram imunizados com MPLA de LPS de *B. pertussis*, Hidróxido de Alumínio e Addavax® juntamente à VSI produzida pelo IB. Foi utilizada a estratégia de uma única imunização com coletas de sangue via retroorbital antes e 21 dias após a imunização.

Camundongos fêmeas BALB/C foram imunizados com 0,4µg de HA de cada cepa por via SC. Os grupos experimentais foram: **I.** 0,4µg HA; **II.** 0,4µg HA+MPLA; **III.** 0,4µg HA+Al(OH)₃; **IV.** 0,4µg HA+ MPLA+Al(OH)₃; **V.** 0,4µg HA+Addavax® e **VI.** 3,75µg HA.

A coleta de sangue teve como objetivo a extração do soro para realização de ELISA e do ensaio HI. Em relação aos anticorpos IgG específicos quantificados por ELISA, apenas o

grupo imunizado com Addavax[®] foi capaz de produzir uma quantidade significativamente maior de IgG, sendo 3 vezes maior que o controle positivo (Figura 15).

Figura 15 Quantificação de anticorpos específicos IgG de animais imunizados com VSI, MPLA e $\text{Al}(\text{OH})_3$

ELISA de IgG total, específico para VSI, do soro de animais imunizados 21 dias após a imunização. As barras representam a média entre os animais e o desvio padrão, cada símbolo representa um animal por grupo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, One way Anova, $n=5$.

Foram verificados os níveis de anticorpos neutralizantes contra cada cepa através do ensaio HI e apesar do grupo imunizado com Addavax ter apresentado um aumento significativo de anticorpos IgG (quantificados por ELISA), apenas houve um aumento significativo de anticorpos neutralizantes contra a cepa H1N1, sendo pelo menos 5 vezes maior do que os outros grupos. Contra as cepas H3N2 e B é possível ver uma tendência no aumento da produção de anticorpos neutralizantes em relação aos outros, porém não houve significância estatística (Figura 16).

Figura 16 Determinação de anticorpos neutralizantes de animais imunizados com VSI, MPLA e $\text{Al}(\text{OH})_3$

HI para detecção de anticorpos neutralizantes contra influenza (H1N1, H3N2 e B) feito com amostras de soro. **A-C** mostram a razão entre a diluição do soro em que houve a inibição da hemaglutinação (21º dia após a imunização) e do soro pré-imune do respectivo animal. As barras representam a média entre os animais e o desvio padrão, cada símbolo representa um animal por grupo com * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, One way Anova, $n=5$. **A.** mostra razão contra cepa H1N1; **B.** contra cepa H3N2 e **C.** contra cepa B.

As evidências do experimento descrito com MPLA e o hidróxido de alumínio demonstraram que, mediante as circunstâncias apresentadas, estes adjuvantes não foram eficazes para a VSI. Contudo, a imunização com Addavax resultou em dados em que foi possível observar que tal adjuvante era promissor com a VSI e por isso demos continuidade no estudo deste adjuvante.

4.3.2 Flagelina e Addavax® como adjuvantes para a VSI administrados pela via SC

Animais foram imunizados com os adjuvantes, Flagelina e Addavax® formulados com a VSI produzida pelo IB. Neste experimento também foi utilizada a estratégia de uma

única dose de imunização com coletas de sangue via retroorbital em diferentes tempos experimentais (1, 7, 14 e 21 dias após a imunização). A eutanásia dos animais foi feita 21 dias após a imunização, com retirada dos linfonodos para avaliação da resposta imune adquirida por citometria de fluxo.

Camundongos fêmeas BALB/C foram imunizados com 0,4µg de HA de cada cepa por via SC. Os grupos experimentais foram: **I.** Salina; **II.** Flagelina; **III.** Addavax®; **IV.** 0,4µg HA; **V.** 0,4µg HA+Flagelina; **VI.** 0,4µg HA+Addavax® e **VII.** 3,75µg HA.

Os PBMCs coletados um dia após a imunização foram marcados para caracterização de DCs e Monócitos para avaliação por citometria de fluxo, as populações celulares foram analisadas a partir de uma população de APCs (Figura 17). Escolhemos avaliar estas populações celulares devido aos papéis que desempenham, de modo geral, os monócitos fazem parte da primeira linha de células de defesa e as DCs são a ponte dos sistemas inato e adaptativo. Neste tempo experimental foi observado um aumento de até duas vezes na porcentagem de pDCs totais e ativadas nos grupos de animais que receberam a vacina com Flagelina e Addavax® (Figura 18). As pDCs são consideradas células muito importantes na imunidade antiviral devido à sua capacidade na produção de IFN do tipo I e apresentação de antígenos para células T. O fato dos adjuvantes aumentarem a porcentagem dessa população celular um dia após a imunização, aumentou as expectativas para que houvesse uma potencialização da resposta imune da VSI juntamente com esses adjuvantes.

Figura 17 Estratégia de análise das APCs no sangue periférico

Figura representativa da estratégia de gate de APCs para análise de subpopulações celulares. Citometria de fluxo de PBMCs de animais 1 dia após a imunização, software Flowjo.

Figura 18 Análise das DCs periféricas dos animais imunizados com VSI, Flagelina e Addavax®

PBMCs de animais Balb/c fêmeas, coletados 1 dia após a imunização por via SC. Imunofenotipagem por citometria de fluxo e aquisição das amostras no equipamento FACSCanto II, n=5/grupo. Porcentagem das populações celulares dentro de PBMCs, as barras representam a média entre os animais e desvio padrão, cada símbolo representa um animal por grupo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (one way ANOVA, posteriori Tukey Test). **A.** Células Dendríticas Plasmocitóides, **B.** PDCs Ativadas, **C.** DCs Mielóides Ativadas.

Houve uma diminuição significativa de mais de 50% da população de monócitos M2 nos grupos imunizados com a vacina e Flagelina/Addavax® em comparação ao grupo controle 3,75 μ g (Figura 19A). Monócitos M2 podem ser imunofenotipados pela presença de CD206, além de CD11b e F480 (Kigerl, et al., 2010), ainda que estas não sejam características exclusivas destas células. Os M2 são resultado de um ambiente anti-inflamatório com a produção de citocinas como IL-10, em resposta a citocinas como IL-4 e IL-13 (Geissmann *et al.*, 2003). A associação dos marcadores CD11b, F480, Ly6C e ausência do marcador CD11c- ajudam a caracterizar Monócitos Inflamatórios (Kigerl, et al., 2010). Nossos resultados mostram que também ocorreu uma diminuição significativa de monócitos inflamatórios no grupo imunizado com VSI+Addavax® em relação ao controle positivo (Figura 19B).

Os PBMCs, dos dias 7 e 14 após a imunização, foram marcados com B220 CD19, CD4, CD8, CD62L e CD44 para caracterização de linfócitos B e T. Apenas após 14 dias da imunização é que foi possível detectar resultados relevantes, nos quais vimos um aumento significativo de células CD4⁺ efetoras no grupo da vacina com Addavax[®] em comparação com os grupos salina, controle positivo (3,75µg de HA) e com apenas 0,4 µg de HA (Figura 19C). Na análise de ativação das células TCD4⁺ devem ser levados em consideração outras moléculas de superfície além de CD3 e CD4, apenas uma população com o fenótipo CD3⁺ CD4⁺ CD44^{high} CD62L^{low} é uma célula de memória efetora (Hu e August, 2008).

Figura 19 Análise de populações celulares periféricas dos animais imunizados com VSI formulada com Flagelina ou Addavax[®]

PBMCs de animais Balb/c fêmeas, coletados 1 (A e B) e 14 (C) dias após a imunização por via SC. Imunofenotipagem por citometria de fluxo e análise no aparelho FACSCanto II. n=5. As barras representam a média entre os animais e o desvio padrão, cada símbolo representa um animal por grupo, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (one way ANOVA, posteriori Tukey Test). **A.** Macrófagos M2; **B** Macrófagos e **C.** Linfócito T CD4⁺ Efetor. Os resultados são demonstrados em porcentagem dessas populações dentro de células totais das PBMCs.

Os ensaios de ELISA para quantificação de anticorpos específicos totais, mostraram que os animais imunizados com 0,4µg HA+Addavax® produziram anticorpos IgG1 e IgG2a após 21 dias de imunização, havendo diferença estatística significativa com quase todos os grupos experimentais, sendo que a diferença com a dose mais alta da vacina foi de 1 log (Figura 20). O grupo imunizado com Flagelina apresentou níveis de concentração de anticorpos semelhante ao grupo com 0,4µg HA, que é a dose mais baixa de HA.

A segregação dos isotipos de imunoglobulina IgG2a e IgG1 como marcadores para as respostas dos tipos Th1 e Th2, respectivamente, foi investigada nos camundongos imunizados. A formulação com Addavax® apresentou uma resposta imune predominantemente Th2, apesar de ter havido aumento na concentração sérica de IgG2a também (Figura 20). Os dados encontrados corroboram com a hipótese de que a concentração de monócitos M2 estava significativamente menor no grupo com Addavax®, 1 dia após a imunização, pois se encontravam no local da administração da vacina e por estarem envolvidos da resposta Th2.

Figura 20 Concentração de anticorpos específicos IgG1 e IgG2a em animais imunizados com VSI Flagelina e Addavax®

As amostras de soro foram retiradas 21 dias após a imunização, e os títulos de anticorpos IgG1 e IgG2a para a VSI foram medidos por ELISA. As barras representam a média aritmética de cada grupo e o desvio padrão, cada símbolo representa a razão de IgG1/IgG2a de cada animal por grupo com ***p < 0.001, One way Anova, posteriori Tukey Test, n=5.

No HI podemos observar que houve uma produção estatisticamente significativa de anticorpos neutralizantes contra H1N1 e H3N2 pelos animais do grupo imunizado com o antígeno e Addavax® em relação aos outros grupos. Em relação à cepa B, não houve diferença

estatisticamente significativa entre os grupos, mas se observa um aumento de anticorpos neutralizantes no grupo imunizado com vacina e Addavax® (Figura 21).

Figura 21 Determinação de anticorpos neutralizantes em animais imunizados com VSI, Flagelina e Addavax®

HI para detecção de anticorpos neutralizantes contra influenza (H1N1, H3N2 e B) feito com amostras de soro. As barras representam a média aritmética e o desvio padrão de cada grupo, cada símbolo representa a razão entre a diluição de inibição da hemaglutinação do 21º dia após a imunização e do soro pré-imune do respectivo animal. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, One way Anova, $n=5$. **A.** mostra razão contra cepa H1N1; **B.** contra cepa H3N2 e **C.** contra cepa B.

O Addavax se mostrou um adjuvante eficaz para a VSI, pois aumentou significativamente a produção de anticorpos neutralizantes e também a porcentagem de células T CD4+ efectoras, sistemicamente. A Flagelina, com o antígeno utilizado, possivelmente não promove a potencialização da resposta imune, porém o adjuvante modula a resposta imune inicial de APCs quando administrada junto com a vacina, devido a esse fato realizamos mais experimentos com este adjuvante, porém formulado com a vacina monovalente da cepa H7N9.

4.3.3 Flagelina como adjuvante para as vacinas monovalentes de H1N1 e H7N9 administrada pela via SC

Imunizamos os animais com as vacinas monovalentes da Influenza H1N1 e H7N9 com e sem o adjuvante Flagelina. Foi utilizada a vacina monovalente de H1N1 e não a vacina trivalente sazonal, pois esta é a cepa que apresentou resultados mais homogêneos e claros, em relação à ação de adjuvantes e por já ter sido relatado na literatura, a eficácia do adjuvante com esse antígeno (Skountzou *et al.*, 2010). Os grupos experimentais foram: **I.** Flagelina; **II.** 3,75µg H7N9; **III.** 1,2µg H1N1; **IV.** 3,75µg H7N9+Flagelina e **V.** 1,2µg H1N1+Flagelina.

A estratégia experimental desta etapa foi de imunização *prime/booster* com 21 dias de diferença entre as duas doses. A mudança de estratégia ocorreu para verificar se, com uma segunda imunização, a flagelina seria capaz de aumentar a produção de anticorpos neutralizantes já que isto não ocorreu com apenas uma dose, como foi descrito anteriormente. O sangue periférico foi coletado via retroorbital ao longo do experimento e os animais foram sacrificados 57 dias após a primeira imunização.

O sangue periférico do primeiro dia (D1), após a primeira dose, foi utilizado para imunofenotipagem de APCs. Observamos nestes resultados que as formulações antígeno+flagelina, induziram o aumento das pDCs totais (CD11c+, LY6C+, B220+, CD4+ (Merad *et al.*, 2013)) e ativadas em relação a seus respectivos grupos sem adjuvante (Figura 22).

Figura 22 Análise de populações celulares periféricas dos animais imunizados com vacinas monovalentes de Influenza e Flagelina como adjuvante

PBMCs de animais Balb/c 1 dia após a imunização. Imunofenotipamos pDCs totais (A) (CD11c+

Ly6C+ B220+ CD4+) e ativadas (B) (CD86+ CD11c+ Ly6C+ B220+ CD4+) por citometria de fluxo, os resultados são demonstrados em porcentagem dessas populações dentro de células totais das PBMCs. As barras representam a média entre os animais e o desvio padrão, cada símbolo representa um animal por grupo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, One way Anova, $n=5$.

Após 21 dias da imunização analisamos a resposta humoral contra os antígenos. Os dados da quantificação dos anticorpos específicos por ELISA mostraram que não houve diferença significativa de produção de IgG entre os grupos que foram imunizados com vacinas formuladas com e sem o adjuvante flagelina (Figura 23).

Figura 23 Quantificação de anticorpos específicos contra H7N9 e H1N1 após a segunda imunização

ELISA de IgG total contra H1N1 e H7N9 de soro de animais imunizados 21 dias após a segunda imunização (booster). As barras representam a média entre os animais e o desvio padrão, cada símbolo representa um animal por grupo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, One way Anova, $n=5$.

Nos HIs (coletas de soro feitas nos D21 e D42) foi possível observar uma maior produção de anticorpos neutralizantes do grupo imunizado com flagelina comparado à salina, apenas no tempo D21 e com a vacina monovalente da cepa H7N9 (Figura 24B). A flagelina promove uma homogeneização na produção de anticorpos neutralizantes pelos animais, apesar de não ter sido eficiente quando se compara com a imunização sem adjuvante (não há diferença estatística entre os dois grupos).

Figura 24 Determinação dos anticorpos neutralizantes em animais imunizados com H7N9 e H1N1 com Flagelina por via SC

HI para detecção de anticorpos neutralizantes contra a cepa H7N9 e H1N1 feito com amostras de soro. O gráfico mostra a razão entre o 21º dia após a imunização e o respectivo soro pré-imune do animal. As barras representam a média entre os animais e o desvio padrão, cada símbolo representa um animal por grupo, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; One way Anova, $n=5$.

A flagelina não foi capaz de induzir o aumento da produção de anticorpos específicos e neutralizantes quando administrada pela via SC com vacinas monovalentes da Influenza, apesar de dobrar a porcentagem de pDCs sistêmicas após um dia de imunização.

4.3.4 Flagelina como adjuvante para a vacina monovalente H7N9 pela via IM e intranasal (IN)

Prosseguimos com o estudo da flagelina e o antígeno H7N9, e foi realizado um experimento com duas vias de imunizações diferentes, a IM e a IN. A via IN foi utilizada pois, foi a via escolhida em outros trabalhos que identificaram um efeito adjuvante com vacinas da Influenza, além disso a flagelina se trata de um adjuvante de mucosa (Ramos *et al.*, 2004) podendo, portanto, ser o ambiente ideal para seu efeito adjuvante. A escolha da via IM ocorreu pois, é a via mais utilizada para a imunização em humanos. Não havíamos utilizado a via IN até então pela dificuldade da formulação com volumes inferiores a 25µl.

Camundongos fêmeas BALB/C foram imunizados seguindo os seguintes grupos experimentais: **I.** 3,5µg H7N9 (via IM); **II.** 3,5µg H7N9 (via IN); **III.** 3,5µg H7N9 (via IM) + Flagelina (via IN) e **IV.** 3,5µg H7N9+Flagelina (via IM). A estratégia experimental desta etapa foi de imunização *prime/booster* com 14 dias de diferença entre as duas doses.

No ELISA feito com o soro extraído do sangue coletado 14 dias após a primeira dose, foi possível observar que, apesar de não ter diferença significativa, os animais do grupo

imunizado com flagelina e o antígeno por via IN produziram dez vezes mais anticorpos específicos do que os imunizados sem adjuvante pela mesma via (Figura 25). Surpreendentemente a imunização IN sem adjuvante não foi mais eficaz do que a IM com apenas uma dose, sendo esta, a via de imunização mais eficaz com a produção de 30 vezes mais anticorpos específicos, não houve, provavelmente, diferença estatística devido ao número de animais.

Figura 25 Quantificação dos anticorpos específicos em animais imunizados com H7N9 + Flagelina por diferentes vias de administração

ELISA de IgG total contra H1N1 e H7N9 (respectivamente com suas determinadas formulações) de soro de animais imunizados 21 dias após a segunda imunização (booster). As barras representam a média entre os animais e o desvio padrão, cada símbolo representa um animal por grupo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, One way Anova, $n=5$.

Quando analisamos os anticorpos neutralizantes após a primeira dose, o padrão de que a imunização IM é mais eficaz do que a IN prevalece, porém não é possível observar diferenças na administração intranasal com e sem adjuvante (Figura 26A).

Após a segunda dose os anticorpos neutralizantes dos animais dos grupos imunizados sem adjuvante e pela via IM e com o adjuvante por via IN, apresentaram níveis semelhantes (Figura 26B).

Figura 26 Determinação dos anticorpos neutralizantes em animais imunizados com H7N9+ Flagelina por diferentes vias de administração

HI para detecção de anticorpos neutralizantes contra a cepa H7N9 feito com amostras de soro. Os gráficos mostram a razão entre o 14°(A) ou 35° (B) dia após a primeira imunização e o respectivo soro pré-imune do animal. **A.** primeira dose, **B.** segunda dose. As barras representam a média entre os animais e o desvio padrão, cada símbolo representa um animal por grupo, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; One way Anova, $n=5$.

A flagelina quando administrada por via IN juntamente com o antígeno promove, após a segunda dose, um aumento na produção de anticorpos neutralizantes em comparação aos animais imunizados sem o adjuvante pela mesma via. Entretanto, a formulação sem adjuvante administrado pela via IM faz com que os animais produzam os mesmos níveis de anticorpos neutralizantes que o antígeno com a flagelina pela via IN. Sendo assim, a flagelina não foi um adjuvante eficaz para vacinas da Influenza.

Contudo, o Addavax® se mostrou o adjuvante mais eficiente para a VSI levando à produção de anticorpos neutralizantes com ativação tanto da resposta do tipo Th1, quanto do tipo Th2, indicada pelo aumento significativo de IgG1 e IgG2a.

Diante de tais conclusões, o Addavax® foi escolhido como o adjuvante mais eficaz nestas condições, tornando-se o foco deste projeto para caracterização de sua resposta imune quando formulado com a VSI produzida pelo IB.

4.4. Emulsão de óleo em água como adjuvante para VSI

A caracterização da resposta imune da emulsão de óleo em água com a VSI foi iniciada com o objetivo de identificarmos os mecanismos envolvidos para sua eficácia. A primeira etapa consistiu na investigação das diferenças entre administrações SC e IM das formulações escolhidas em camundongos BALB/c fêmeas. Para isso, foram feitos três blocos

de grupos experimentais, um com administrações SC e dois com IM. Os grupos presentes em cada bloco foram: Salina; Addavax®; 0,4µg HA (de cada HA) e 0,4µg HA+Addavax® (de cada HA).

A estratégia experimental desta etapa foi de dose única com coletas de sangue periférico ao longo do experimento e extração do músculo adutor longo para avaliação da resposta imune local. Para a avaliação da resposta imune local, realizamos o experimento com um bloco dos grupos dos animais que receberam imunização por via IM, estes foram eutanasiados 2 dias após a imunização. O outro bloco que recebeu imunização IM e o bloco que recebeu imunização por via SC foram eutanasiados 21 dias após a imunização.

O sangue periférico do dia 2 após a imunização foi utilizado para imunofenotipagem de APCs. As APCs avaliadas e seus fenótipos foram: Macrófagos (CD11b+F480+Ly6C+CD11c-), Monócitos Inflamatórios (CD11bhighCD11c-LY6C++), DCs (CD11c+CD11bhigh IaIe+), Eosinófilos (LY6Gint F480int) e neutrófilos (Ly6g++F480-).

Observamos que, inclusive com a mesma formulação vacinal, a via de administração induz diferenças na resposta imune, alterando a porcentagem de células presentes no sangue periférico. As principais populações celulares em que foi observado aumento da porcentagem no sangue periférico na administração IM foram os Macrófagos e os Neutrófilos (Figura 27).

Figura 27 Análise das populações celulares circulantes comparando as vias de administração SC e IM

Comparação das vias de administração subcutânea (SC) e intramuscular (IM) representada pelas porcentagens de aumento das populações celulares em relação ao controle após 2 dias após a imunização medidas por citometria de fluxo. Porcentagem das populações de Macrófagos

(CD11b+F480+Ly6C+CD11c-), Monócitos Inflamatórios (CD11b^{high}CD11c-LY6C⁺⁺), DCs (CD11c+CD11b^{high} IaIe+), Eosinófilos (LY6G^{int} F480^{int}) e neutrófilos (Ly6g⁺⁺F480-) dentro de população de APCs no PBMC dos camundongos. Resultados apresentados em média aritmética, n=5.

Entre as formulações com ou sem adjuvante administradas por via IM, a população que mais aumentou na presença do Addavax® foi a de Neutrófilos (Figura 29B). A população de macrófagos entre os grupos que foram imunizados via IM não apresentou aumento significativo (Figura 28A).

Figura 28 Análise dos macrófagos e neutrófilos periféricos após a imunização pelas vias SC e IM

PBMCs de animais Balb/c coletados 2 dias após a imunização. Imunofenotipagem de macrófagos (CD11b+ F480+ LY6C+) e neutrófilos (Ly6G high F480-) por citometria de fluxo. As populações foram analisadas dentro da população total de APCs no PBMC de camundongos. As barras representam a média entre os animais e o desvio padrão, cada símbolo representa um animal por grupo, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, One way Anova, n=5.

Porém ao avaliar por citometria de fluxo, o recrutamento das APCs nos músculos quadríceps em que se foi administrada a vacina, os animais imunizados com Addavax apresentaram um recrutamento maior de APCs do que o grupo imunizado apenas com o antígeno, as porcentagens das diferentes populações celulares aqui analisados foram feitas dentro de APCs (Figura 29). Este experimento reforçou que o adjuvante Addavax® cria um microambiente favorável para a captação do antígeno, aumentando a quantidade de todas as APCs e células inflamatórias aqui estudadas (Ott *et al.*, 1995) (Figura 30).

Figura 29 Estratégia de análise de APCs no músculo por citometria de fluxo

Figura representativa da estratégia de análise de subpopulações celulares. Citometria de fluxo do músculo de animais 2 dias após a imunização, software Flowjo.

Figura 30 Análise das populações das APCs no músculo

Porcentagem de aumento das células apresentadas dentro de APCs em relação ao grupo controle, apresentadas em média aritmética, n=5. Porcentagem das populações de Macrófagos (CD11b+F480+Ly6C+CD11c-), Monócitos Inflamatórios (CD11bhighCD11c-LY6C++), DCs (CD11c+CD11bhigh Iale+), Eosinófilos (LY6Gint F480int) e Neutrófilos (Ly6g++F480-) As populações foram analisadas dentro da população total de APCs no músculo adutor longo de camundongos.

Foi realizado um imunoensaio para avaliação da secreção de citocinas presentes no soro dos animais após dois dias de imunização. É possível observar um aumento significativo de TNF- α nos grupos imunizados pela via IM com e sem o adjuvante Addavax, esse mesmo padrão foi detectado em relação a IFN- γ , IL-5, IL-2 e IL-10 (Figura 31). A única citocina que apresentou níveis maiores quando administrada por via SC foi a GM CSF (Figura 31E). As

demais citocinas avaliadas presentes no kit não apresentaram diferença entre os grupos e imunizações.

Figura 31 Citocinas secretadas no soro de animais imunizados com VSI e Addavax® pelas vias SC e IM

Secreção das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-5, IL-10, GM CSF e IL-2 nas amostras de soro dos camundongos após 2 dias da imunização. Os debris foram removidos por centrifugação e as citocinas

foram quantificadas pelo kit da Biorad Bio-plex pro Mouse Cytokine 23-plex Group I. As barras representam as médias obtidas nos grupos com os desvios padrão (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; Teste One-way ANOVA com pós teste de Tukey). Os valores em 10^0 indicam resultados abaixo do nível de detecção indicado pelo fabricante.

O ELISA de IgG total (soro de 21 dias após a imunização) confirma a diferença entre os dois tipos de administração, sendo que a via IM apresentou maior produção de anticorpos em relação a SC (Figura 32).

Figura 32 Quantificação de anticorpos específicos do soro de animais imunizados com VSI+Addavax® pelas vias SC e IM

As amostras de soro foram retiradas 21 dias após a imunização, e os títulos de anticorpos IgG total para a VSI foram medidos por ELISA. As barras representam a média aritmética de cada grupo e o desvio padrão, cada símbolo representa um animal por grupo com *** $p < 0.001$, One way Anova, posteriori Tukey Test, $n=5$.

O ensaio de HI confirmou maior produção de anticorpos neutralizantes no grupo imunizado com Addavax® por via IM (Figura 33), portanto apesar do adjuvante sozinho também ser capaz de aumentar o recrutamento de células dois dias após a imunização, apenas quando ele está formulado com o antígeno HA há a produção de anticorpos específicos contra Influenza.

Figura 33 Comparação na produção de anticorpos neutralizantes entre via de imunização SC e IM

HI para detecção de anticorpos neutralizantes contra cada cepa da VSI feito com amostras de soro. O gráfico mostra a razão entre o 21º dia após a imunização e o respectivo soro pré-imune do animal. As barras representam a média entre os animais e o desvio padrão, cada símbolo representa um animal por grupo. Os dados do bloco da esquerda são da administração SC e o da direita são da administração IM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, One way Anova, $n=5$.

No estudo de mediadores imunológicos secretados em resposta às imunizações com VSI e Addavax, primeiramente realizamos um ensaio para detectar se, após 21 dias da

imunização, há células do sistema imune que respondem rapidamente ao estímulo vacinal, esta resposta foi então considerada uma resposta imunológica de memória. Sendo assim, após 21 dias da imunização cultivamos as células dos linfonodos drenantes (axiais e inguinais) e as estimulamos por 72 horas, momento em que seu sobrenadante foi coletado. Como se pode observar na figura 34, a imunização IM de VSI com Addavax produziu um aumento da citocina próinflamatória TNF- α porém, no caso de IFN- γ , observamos um aumento desta citocina apenas na imunização IM sem adjuvante. O uso de Addavax inibiu IFN- γ , talvez por ser um adjuvante conhecido como indutor, também de citocinas regulatórias que podem ter induzido a inibição IFN- γ no tempo de 72h.

Concluimos com estes resultados que a administração de Addavax induziu a produção da citocina TNF- α por células de memória e específicas, em resposta à VSI. Os antígenos de VSI induziram TNF- α e IFN- γ , estas diminuíram, porém não totalmente, com a imunização com Addavax.

Figura 34 Citocinas secretadas no sobrenadante dos linfonodos drenantes dos animais imunizados com VSI e Addavax pelas vias SC e IM

Secreção das citocinas IFN- γ , TNF- α , nas amostras de sobrenadante de cultura de células de linfonodos dos camundongos imunizados estimulados ou não com VSI. As células foram removidas por centrifugação e as citocinas foram quantificadas pelo kit de Bio-Plex Mouse Cytokine 23-plex. As barras representam as médias obtidas nos grupos com os desvios padrão (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; Teste One-way ANOVA com pós teste de Tukey). Os valores em 10^0 indicam resultados abaixo do nível de detecção indicado pelo fabricante

A análise das populações de células imunes recrutadas no músculo (IM) reforçou que, possivelmente, o adjuvante cria um microambiente favorável para a absorção do antígeno, aumentando as quantidades de APCs e neutrófilos combinados com a produção de anticorpos específicos contra a Influenza.

A VSI utilizada ao longo de todo este projeto provém de um mesmo lote, fabricado em 2014. O objetivo em utilizar sempre o mesmo lote, foi ser possível comparar fielmente os experimentos. Porém, o longo tempo de armazenamento prejudicou a estabilidade da vacina, reduzindo a quantidade de HA em um mesmo volume. Essas informações só foram obtidas após

ser constatada uma diminuição nos títulos de anticorpos totais e neutralizantes das imunizações mais recentes.

5. Discussão

O presente trabalho visou caracterizar a resposta imune produzida pelas vacinas sazonal da influenza e contra H7N9 formuladas com diferentes adjuvantes, além da tentativa de caracterizar o mecanismo de ação do adjuvante emulsão de óleo em água com a VSI.

A vacinação contra influenza é a intervenção mais importante na redução do impacto deste vírus e vem sendo praticada há mais de cinco décadas (Hoyt, 2006). Apesar de ser considerada uma vacina bem-sucedida, sua demanda anual está em constante crescimento e por sua produção ser um processo de alto custo (devido à possibilidade de reformulação anual) produtores de vacina recomendaram sua formulação com adjuvantes.

O IB é o único produtor de VSI da América Latina e sua fábrica foi construída para produzir 20 milhões de doses de VSI por campanha, entretanto esta demanda é de aproximadamente 50 milhões de doses (Lenharo, 2016). Utilizando adjuvantes nesta vacina seria possível aumentar a capacidade de produção sem que sejam necessários grandes investimentos.

A compreensão da base imunológica para uma imunização bem-sucedida da vacina da Influenza, foi facilitada pela adaptação de muitas cepas ao crescimento em meios de cultura, pela disponibilidade de modelos animais e pela experiência prática da imunização humana ao longo de 50 anos (Dormitzer, 2010). No Laboratório de Bacteriologia 2 do IB utilizamos modelos animais de camundongos BALB/c para a caracterização imunológica de vacinas Influenza, produzidas no próprio Instituto, com diferentes adjuvantes.

O hidróxido de alumínio é o adjuvante mais utilizado para vacinas humanas, no entanto, no caso de vacinas contra a Influenza, forneceu resultados variáveis. Observamos que apenas o uso de hidróxido de alumínio como adjuvante para vacina da Influenza não foi capaz de promover um aumento da resposta imune humoral, sendo concordante com outros trabalhos publicados por outro grupo de nosso instituto (Quintilio *et al.*, 2009).

Estudos prévios realizados com MPLA+ Hidróxido de Alumínio mostraram um aumento de 10 vezes na produção de anticorpos específicos contra vacinas da Influenza induzidas por este adjuvante comparado com a formulação sem adjuvante, contudo neste trabalho não foram realizados ensaios com a VSI (Quintilio *et al.*, 2009). É possível que o efeito do MPLA seja cepa dependente, já que o estudo foi realizado com vacinas monovalentes da

Influenza. Além disso, a via de administração (intraperitoneal) foi diferente da que utilizamos (subcutâneo) e o lote de MPLA disponibilizado para este trabalho, não foi o mesmo que o utilizado anteriormente por Quintilio, esses fatores podem ter gerado uma resposta diferente da que foi aqui observada.

A mudança da via de administração de intraperitoneal para SC ocorreu por ser a que mais se aproximava da administração IM, a via mais utilizada para imunização em humanos. A via IM para camundongos é dificultada devido ao volume máximo injetado no músculo da pata do animal.

A flagelina foi o outro adjuvante abordado neste projeto, sendo a proteína mais abundante que compõe o filamento do flagelo bacteriano e um potente indutor da resposta imune inata. Por esta razão, é reconhecida como um candidato a adjuvante de vacinas, a indução dessa resposta é através do receptor TLR5 (Hayashi *et al.*, 2001)

Os TLRs são receptores de reconhecimento de antígeno (PRRs) presentes na membrana de APCs que reconhecem as PAMPs (estruturas moleculares de patógenos), por isso desempenham um papel chave na imunidade inata por desencadear a primeira linha de defesa contra patógenos invasores. Cada TLR reconhece um conjunto diferente, ou subgrupo, de antígenos que varia de acordo com seu ligante do receptor (Takeda *et al.*, 2003).

A interação de TLR5 com flagelina induz a sinalização dependente de MyD88 que ativa o fator de transcrição pró-inflamatório NF- κ B nas células epiteliais, monócitos e DCs, resultando na ativação de respostas imunes inatas contra esse antígeno (Smith *et al.*, 2003). A funcionalidade da Flagelina aqui utilizada foi confirmada por experimentos *in vitro* com células HEK-Blue™-hTLR5 e HEK-Blue™-mTLR5, pois pequenas quantidades do adjuvante (na ordem de nanogramas) foram suficientes para ativação de TLR5 de tais células. Entretanto através de SDS-page foi possível observar (Figuras 12 e 13) que a flagelina não se encontra, em sua totalidade, na forma de monômero quando administrada. Tal fato pode haver prejudicado o desempenho da flagelina como adjuvante das vacinas da Influenza.

A flagelina foi primeiramente administrada por via SC e foi capaz de aumentar as porcentagens de pDCs (VSI e H7N9) e aumentar as células T CD4 efetoras em 50%, no sangue periférico um, e 21 dias após a imunização, respectivamente (em relação ao grupo imunizado com apenas a vacina), apesar disso não foi suficiente para aumentar a produção de anticorpos neutralizantes. Este adjuvante também não foi capaz de promover um aumento contra a vacina monovalente de H7N9, pela via SC, mesmo após uma segunda imunização (21 dias de intervalo). Entretanto, apesar de não ter sido eficiente quando se compara com a imunização

sem adjuvante (por não haver diferença estatística entre os dois grupos), o adjuvante promove uma resposta homogênea dos animais imunizados pois, a produção de anticorpos neutralizantes é similar entre os animais do mesmo grupo, fato difícil de se observar mesmo com o uso de animais isogênicos como é nosso caso. Embora a produção de anticorpos neutralizantes, seja considerada como a correlato de proteção das vacinas de Influenza, as respostas imunes mediadas por células também podem ser importantes para a indução de proteção cruzada e memória imunológica.

A eficácia da flagelina como adjuvante da vacina monovalente de H1N1 de vírus inteiro e atenuado está descrita na literatura (Skountzou *et al.*, 2010) feita com uma imunização IN e por isso houve mudança na via de administração da formulação vacinal nesta etapa. A imunização com a vacina monovalente de H7N9 e flagelina foi realizada por via IN e IM, a VSI não foi utilizada por tratar-se de uma vacina estabelecida e por isso propor a mudança da sua via de administração seria inviável.

Apesar da imunização IN também não aumentar significativamente a produção de anticorpos neutralizantes quando se compara com a imunização IM sem adjuvante, foi possível observar um aumento de 10 vezes entre a formulação com e sem adjuvante pela via IN. Esse aumento pode ser atribuído ao fato da flagelina ser um adjuvante de mucosa, e, portanto, se liga à TLR5 das células epiteliais do trato respiratório (López-Boado *et al.*, 2005). Estudos que conseguiram observar o efeito adjuvante da flagelina com vacina da Influenza por via IN após *booster*, possuíam vacina de vírus inteiro atenuado (Skountzou *et al.*, 2010) ou vacina de subunidade fusionada com o adjuvante (Song *et al.*, 2017) possivelmente, esse fator pode ter interferido no aumento da produção de anticorpos neutralizantes.

Como foi visto utilizando a Flagelina, a via de imunização tem um importante papel na resposta imune das vacinas e adjuvantes e por isso se realizou um ensaio com VSI e o Addavax em duas diferentes vias, SC e IM.

A emulsão de óleo em água é um adjuvante amplamente estudado e seu uso é licenciado em algumas partes do mundo, como Europa e Estados Unidos, além disso, como já dito anteriormente, sua produção foi iniciada no IB. A caracterização da resposta Imune da VSI formulada, com um adjuvante de fórmula similar ao que está sendo produzido no IB, é essencial para fundamentar e testar a potencialização da resposta imune do antígeno, podendo auxiliar a sustentar evidências para um futuro ensaio clínico com o intuito de obter a aprovação da ANVISA para uso em humanos.

A emulsão de óleo em água, como visto anteriormente, foi o adjuvante aqui testado mais eficaz juntamente com a VSI. Na primeira parte deste estudo foi caracterizada a administração SC dessa formulação.

A formulação de VSI e o adjuvante emulsão de óleo em água, induz uma produção de anticorpos IgG significativa quando comparada à formulação não adjuvantada. Através da avaliação dos títulos das classes IgG1 e IgG2a foi possível observar que a resposta dessa formulação testada era Th2, devido ao seu maior título de anticorpos IgG1 (resposta humoral). A produção de anticorpos do tipo IgG2a estão envolvidos com de citocinas de tipo Th1 (resposta celular) e a produção de IgG1 com as do tipo Th2. Estes dois subtipos de anticorpos IgG são marcadores para resposta Th2 e Th1, respectivamente (Finkelman *et al.*, 1990).

Um dia após a imunização, os animais que receberam a vacina e Addavax® apresentaram uma diminuição significativa da população de monócitos do tipo M2 no sangue periférico (Figura 6A). As evidências nos levam a pensar que pelos M2 estarem envolvidos na resposta Th2 e por sua porcentagem estar significativamente menor neste grupo, talvez, no tempo analisado, a população não se encontrava mais no sangue periférico e sim no local da administração da vacina.

Além dos macrófagos, as DCs exercem um importante papel na imunidade, principalmente, como APCs. Um dia após a imunização com a VSI e Addavax®, houve o aumento de DCs mielóides ativadas e de pDCs ativadas no sangue periférico. Devido às funções dessas populações celulares, de produzirem IFN do tipo I, (Gilliet *et al.*, 2008), e apresentarem os antígenos para células T (Villadangos e Young, 2008), se o adjuvante aumenta sua migração podemos especular que estejam relacionadas ao aumento de resposta imune ocasionada por este composto devido à intensa apresentação de antígeno a linfócitos.

Quando avaliado o sangue periférico 14 dias após a imunização SC, observou-se um aumento significativo de células CD4⁺ efetoras no grupo da vacina com Addavax® (Figura 6C) em comparação com o grupo de animais que foi imunizado sem o adjuvante. O aumento deste tipo celular decorrente do uso do adjuvante sugere que houve uma eficiente apresentação do antígeno as células T e que por isso a quantidade de anticorpos neutralizantes foi maior (diferença significativamente estatística) em comparação ao grupo que recebeu a vacina sem adjuvante, pois as células T CD4 estimulam a expansão clonal dos linfócitos B para produção de anticorpos específicos.

Na segunda parte deste trabalho foi caracterizada a administração de VSI e a emulsão de óleo em água por via IM, evidenciando as diferenças com a via SC.

A via IM apresentou uma produção de anticorpos IgG total (soro de 21 dias após a imunização) específicos para Influenza, dez vezes maior em relação a SC, mostrando uma maior eficiência desta via de administração. Além disso, houve uma secreção de IFN- γ aumentada nos grupos imunizados pela via IM, quando as células dos linfonodos drenantes foram expostos novamente ao antígeno, sugerindo que há uma resposta celular de memória (Figura 35). Gostaríamos de chamar a atenção aqui, que apesar deste resultado ser esperado e que sabemos que não é por acaso que esta vacina é administrada na via parenteral em humanos, diversos trabalhos com modelos animais ainda utilizam outras vias de imunização como a SC ou intraperitoneal, e os resultados podem ser comprometidos por esta razão. Logo, fica clara a importância de estudos experimentais que explorem a resposta imune até mesmo de vacinas amplamente usadas como a sazonal de influenza.

Quando há a comparação de porcentagens de APCs no sangue periférico entre as administrações IM e SC, as populações mais relevantes são os neutrófilos e os macrófagos, sendo que o primeiro se encontra três vezes maior na administração IM do que na SC. No mesmo tempo experimental, é possível observar um aumento significativo de TNF- α , IFN- γ , IL-5, IL-2 e IL-10 nos grupos imunizados pela via IM com Addavax com e sem antígeno, o aumento destas citocinas corrobora com os dados encontrados por citometria de fluxo, de que há um aumento do recrutamento celular quando o Addavax é administrado. Esses achados fortalecem a importância da via de administração da vacina.

A administração IM se destaca, pois foi reportado na literatura que o ATP liberado pelos músculos, no momento da administração, contribui para o desenvolvimento das respostas imune inata e adaptativa induzidas pela emulsão de óleo em água (Vono *et al.*, 2013). A injeção IM está associada à liberação de ATP (Cintra-Francischinelli *et al.*, 2010) e por isso Vono e colaboradores investigaram se a liberação de ATP no local da administração era modificada na presença de MF59[®]. O grupo observou que o adjuvante aumenta a liberação de ATP e que na ausência forçada de ATP (causada por enzima Apyrase – hidrolisa ATP) há a diminuição do recrutamento celular ocasionada por MF59[®] e consequentemente, prejudica a resposta imune inata e adaptativa induzida pelo adjuvante (Vono *et al.*, 2013).

Não é apenas sistemicamente que a VSI formulada com Addavax[®] altera as porcentagens de APCs, localmente (quando administrado via IM) as diferenças entre as porcentagens de APCs que são recrutadas são ainda maiores do que as observadas no sangue periférico, chegando a ser mais de 1000% maior. Uma maior presença de APCs sugere uma

apresentação do antígeno mais eficiente aos linfócitos T, gerando indiretamente uma maior produção de anticorpos.

Os resultados deste projeto reforçaram que o adjuvante Addavax® cria um microambiente favorável para a captação do antígeno (Ott *et al.*, 1995), aumentando a quantidade de todas as APCs aqui estudadas e a produção de anticorpos específicos contra Influenza, e isso ocorre principalmente por via IM. O adjuvante sozinho é capaz de aumentar o recrutamento de células, mas apenas quando ele está formulado com o antígeno há a produção desses anticorpos específicos.

Esperamos com este estudo, contribuir com os novos passos do IB, que está produzindo um adjuvante próprio muito similar ao Addavax®, que apesar de ser amplamente conhecido por sua eficácia, ainda não está licenciado para o uso em humanos no Brasil.

6. Conclusões

- Os resultados obtidos nos levam a concluir que o Addavax® é um adjuvante eficaz para a vacina trivalente produzida no IB, pois levou à produção de altos títulos de anticorpos neutralizantes com diferença estatística significativa, comparado com as formulações sem o adjuvante. Além disso, o Addavax® promoveu aumento significativo de células CD4+ efectoras.
- A administração IM apresentou maior produção de anticorpos específicos e neutralizantes e foi a que mais promoveu recrutamento de APCs, apresentando um aumento local significativo de Macrófagos e Neutrófilos.
- Em relação à Flagelina, com os antígenos utilizados, o adjuvante não foi capaz de promover a potencialização da resposta imune humoral, somente produziu o aumento do recrutamento de pDCss ativadas. Constatou-se que a flagelina é um adjuvante de mucosa pois apesar de não atingir níveis iguais ou superiores a via IM, entre as formulações com e sem adjuvante pela via IN, com a flagelina houve um aumento de 10x na produção de anticorpos específicos
- O MPLA e o hidróxido de alumínio não foram adjuvantes eficientes para a VSI em camundongos por via SC, sendo necessária uma maior caracterização do MPLA fabricado pelo IB para o seguimento dos ensaios biológicos.

Referências

ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V. et al. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. **Nat Immunol**, v. 8, n. 9, p. 942-9, Sep 2007. ISSN 1529-2908.

ADAMI, E. A.; HO, P. L. **Desenvolvimento da produção da vacina contra uma possível gripe pandêmica A(H7N9)**: Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan.

AIDA, Y.; PABST, M. J. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. **J Immunol Methods**, v. 132, n. 2, p. 191-5, Sep 1990. ISSN 0022-1759.

AKASHI, K. et al. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. **Nature**, v. 404, n. 6774, p. 193-7, Mar 2000. ISSN 0028-0836.

ALEXOPOULOU, L. et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. **Nature**, v. 413, n. 6857, p. 732-8, Oct 2001. ISSN 0028-0836.

ALLEN, I. C. et al. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. **Immunity**, v. 30, n. 4, p. 556-65, Apr 2009. ISSN 1097-4180.

BANCHEREAU, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v. 18, p. 767-811, 2000. ISSN 0732-0582.

BARGIERI, D. Y. et al. New malaria vaccine candidates based on the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist Salmonella Typhimurium FlhC flagellin. **Vaccine**, v. 26, n. 48, p. 6132-42, Nov 2008. ISSN 0264-410X.

BONIFIELD, H. R.; HUGHES, K. T. Flagellar phase variation in Salmonella enterica is mediated by a posttranscriptional control mechanism. **J Bacteriol**, v. 185, n. 12, p. 3567-74, Jun 2003. ISSN 0021-9193.

BRACIALE, T. J.; SUN, J.; KIM, T. S. Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 4, p. 295-305, Apr 2012. ISSN 1474-1741.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697.

BRAGA, C. J. et al. Cytotoxic T cell adjuvant effects of three Salmonella enterica flagellins. **Braz J Microbiol**, v. 39, n. 1, p. 44-9, Jan 2008. ISSN 1517-8382.

BREWER, J. M. et al. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. **J Immunol**, v. 163, n. 12, p. 6448-54, Dec 1999. ISSN 0022-1767.

_____. In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. **Eur J Immunol**, v. 26, n. 9, p. 2062-6, Sep 1996. ISSN 0014-2980.

BRITO, L. A.; SINGH, M. Acceptable levels of endotoxin in vaccine formulations during preclinical research. **J Pharm Sci**, v. 100, n. 1, p. 34-7, Jan 2011. ISSN 1520-6017.

BROWN, D. M. et al. CD4 T cell-mediated protection from lethal influenza: perforin and antibody-mediated mechanisms give a one-two punch. **J Immunol**, v. 177, n. 5, p. 2888-98, Sep 2006. ISSN 0022-1767.

BUTANTAN, I. V acina Influenza Sazonal Trivalente (fragmentada e inativada) Disponível em: < <http://www.butantan.gov.br/producao/produtos/Paginas/default.aspx> >. Acesso em: 07/2017.

CASSETTA, L.; CASSOL, E.; POLI, G. Macrophage polarization in health and disease. **ScientificWorldJournal**, v. 11, p. 2391-402, 2011. ISSN 1537-744X.

CASSOL, E. et al. M1 and M2a polarization of human monocyte-derived macrophages inhibits HIV-1 replication by distinct mechanisms. **J Immunol**, v. 182, n. 10, p. 6237-46, May 2009. ISSN 1550-6606.

CASTELLINO, F.; GERMAIN, R. N. Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where, and how. **Annu Rev Immunol**, v. 24, p. 519-40, 2006. ISSN 0732-0582.

CDC. FLUAD™ Flu Vaccine With Adjuvant. Acessado em 01/2018. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/flu/protect/vaccine/adjuvant.htm> >.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M. et al. Bothrops snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 32, p. 14140-5, Aug 2010. ISSN 1091-6490.

COUCH, R. B. et al. A randomized clinical trial of an inactivated avian influenza A (H7N7) vaccine. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e49704, 2012. ISSN 1932-6203.

DE JONG, M. D. et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. **Nat Med**, v. 12, n. 10, p. 1203-7, Oct 2006. ISSN 1078-8956.

DE MELO, F. M. et al. Anti-metastatic immunotherapy based on mucosal administration of flagellin and immunomodulatory P10. **Immunol Cell Biol**, v. 93, n. 1, p. 86-98, Jan 2015. ISSN 1440-1711.

DOHERTY, P. C. et al. Influenza and the challenge for immunology. **Nat Immunol**, v. 7, n. 5, p. 449-55, May 2006. ISSN 1529-2908.

DORMITZER, P. R. G., GRAZIA CASTELLINO, FLORA GOLDING, HANA KHURANA, SURENDER DEL GIUDICE, GIUSEPPE RAPPUOLI, RINO. Influenza vaccine immunology. **Immunological Reviews**, v. 239, 2010.

DOWDLE, W. R.; DOWNIE, J. C.; LAVER, W. G. Inhibition of virus release by antibodies to surface antigens of influenza viruses. **J Virol**, v. 13, n. 2, p. 269-75, Feb 1974. ISSN 0022-538X.

F., W. P.; G., N.; ., K. Y. **Fields virology**. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2007.

FINKELMAN, F. D. et al. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. **Annu Rev Immunol**, v. 8, p. 303-33, 1990. ISSN 0732-0582.

FLEETWOOD, A. J. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. **J Immunol**, v. 178, n. 8, p. 5245-52, Apr 2007. ISSN 0022-1767.

GALLI, G. et al. Adjuvanted H5N1 vaccine induces early CD4+ T cell response that predicts long-term persistence of protective antibody levels. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 10, p. 3877-82, Mar 2009. ISSN 1091-6490.

GAMBLIN, S. J.; SKEHEL, J. J. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. **J Biol Chem**, v. 285, n. 37, p. 28403-9, Sep 2010. ISSN 1083-351X.

GAO, R. et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. **N Engl J Med**, v. 368, n. 20, p. 1888-97, May 2013. ISSN 1533-4406.

GARDNER, E. M. et al. Age-related changes in the immune response to influenza vaccination in a racially diverse, healthy elderly population. **Vaccine**, v. 24, n. 10, p. 1609-14, Mar 2006. ISSN 0264-410X.

GEISSMANN, F.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 71-82, Jul 2003. ISSN 1074-7613.

GERHARD, W. The role of the antibody response in influenza virus infection. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 260, p. 171-90, 2001. ISSN 0070-217X.

GILLIET, M.; CAO, W.; LIU, Y. J. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 8, p. 594-606, Aug 2008. ISSN 1474-1741.

GOTTSCHALK, A. Neuraminidase: the specific enzyme of influenza virus and *Vibrio cholerae*. **Biochim Biophys Acta**, v. 23, n. 3, p. 645-6, Mar 1957. ISSN 0006-3002.

HAYASHI, F. et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 1099-103, Apr 2001. ISSN 0028-0836.

HONKO, A. N. et al. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. **Infect Immun**, v. 74, n. 2, p. 1113-20, Feb 2006. ISSN 0019-9567.

HOYT, K. Vaccine innovation: lessons from World War II. **J Public Health Policy**, v. 27, n. 1, p. 38-57; discussion 58-60, 2006. ISSN 0197-5897.

HU, J.; AUGUST, A. Naive and innate memory phenotype CD4+ T cells have different requirements for active Itk for their development. **J Immunol**, v. 180, n. 10, p. 6544-52, May 2008. ISSN 0022-1767.

HUANG, R. et al. Profiles of acute cytokine and antibody responses in patients infected with avian influenza A H7N9. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e101788, 2014. ISSN 1932-6203.

ICHINOHE, T.; PANG, I. K.; IWASAKI, A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. **Nat Immunol**, v. 11, n. 5, p. 404-10, May 2010. ISSN 1529-2916.

INVIVOGEN. AddaVax™ Squalene-based oil-in-water adjuvant. 2017. Disponível em: <<http://www.invivogen.com/PDF/AddaVax.pdf>>.

JACKSON, L. A. et al. Effect of Varying Doses of a Monovalent H7N9 Influenza Vaccine With and Without AS03 and MF59 Adjuvants on Immune Response: A Randomized Clinical Trial. **JAMA**, v. 314, n. 3, p. 237-46, Jul 2015. ISSN 1538-3598.

JAYASEKERA, J. P.; MOSEMAN, E. A.; CARROLL, M. C. Natural antibody and complement mediate neutralization of influenza virus in the absence of prior immunity. **J Virol**, v. 81, n. 7, p. 3487-94, Apr 2007. ISSN 0022-538X.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat Immunol**, v. 11, n. 5, p. 373-84, May 2010. ISSN 1529-2916.

KHORUTS, A. et al. A natural immunological adjuvant enhances T cell clonal expansion through a CD28-dependent, interleukin (IL)-2-independent mechanism. **J Exp Med**, v. 187, n. 2, p. 225-36, Jan 1998. ISSN 0022-1007.

KILBOURNE, E. D. **New Approaches to the Prevention of Influenza**. Journal of Internal Medicine 1975.

KLENK, E.; STOFFEL, W. [Neuraminic acid containing glycoproteins in the blood serum]. **Hoppe Seylers Z Physiol Chem**, v. 302, n. 4-6, p. 286-8, Dec 1955. ISSN 0018-4888.

LACAGNINA, M. J.; WATKINS, L. R.; GRACE, P. M. Toll-like receptors and their role in persistent pain. **Pharmacol Ther**, Oct 2017. ISSN 1879-016X.

LAMB, R.; KRUG, R. *Orthomyxoviridae* : the viruses and their replication. In: (Ed.). **Fields virology / editors-in-chief, David M. Knipe, Peter M. Howley ; associate editors, Jeffrey I. Cohen ... [et al.]**. 4th, 2001. p.1487 - 1531.

LE MOIGNE, V.; ROBREAU, G.; MAHANA, W. Flagellin as a good carrier and potent adjuvant for Th1 response: study of mice immune response to the p27 (Rv2108) Mycobacterium tuberculosis antigen. **Mol Immunol**, v. 45, n. 9, p. 2499-507, May 2008. ISSN 0161-5890.

LENHARO, M. **Butantan já produziu metade das doses da vacinas de gripe do SUS**. G1. G1: <http://g1.globo.com/bemestar/noticia/2016/03/butantan-ja-produziu-metade-das-doses-da-vacinas-de-gripe-do-sus.html> p. 2016.

LEVIN, J.; BANG, F. B. THE ROLE OF ENDOTOXIN IN THE EXTRACELLULAR COAGULATION OF LIMULUS BLOOD. **Bull Johns Hopkins Hosp**, v. 115, p. 265-74, Sep 1964. ISSN 0097-1383.

LI, Q. et al. Epidemiology of human infections with avian influenza A(H7N9) virus in China. **N Engl J Med**, v. 370, n. 6, p. 520-32, Feb 2014. ISSN 1533-4406.

LINDBLAD, E. B. **Aluminium adjuvants**. John Wiley & Sons Ltd: 1995. pp. 21–35.

LIU, C. et al. Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. **J Virol**, v. 69, n. 2, p. 1099-106, Feb 1995. ISSN 0022-538X.

LUND, J. M. et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 15, p. 5598-603, Apr 2004. ISSN 0027-8424.

LYCKE, N. Is the choice of vaccine adjuvant critical for long-term memory development? **Expert Rev Vaccines**, v. 9, n. 12, p. 1357-61, Dec 2010. ISSN 1744-8395.

LÓPEZ-BOADO, Y. S.; COBB, L. M.; DEORA, R. Bordetella bronchiseptica flagellin is a proinflammatory determinant for airway epithelial cells. **Infect Immun**, v. 73, n. 11, p. 7525-34, Nov 2005. ISSN 0019-9567.

MACKANESS, G. B. Cellular resistance to infection. **J Exp Med**, v. 116, p. 381-406, Sep 1962. ISSN 0022-1007.

MANNHALTER, J. W. et al. Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminium hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation. **Clin Exp Immunol**, v. 61, n. 1, p. 143-51, Jul 1985. ISSN 0009-9104.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 451-83, 2009. ISSN 0732-0582.

MATA-HARO, V. et al. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. **Science**, v. 316, n. 5831, p. 1628-32, Jun 2007. ISSN 1095-9203.

MBOW, M. L. et al. New adjuvants for human vaccines. **Curr Opin Immunol**, v. 22, n. 3, p. 411-6, Jun 2010. ISSN 1879-0372.

MCSORLEY, S. J. et al. Bacterial flagellin is an effective adjuvant for CD4+ T cells in vivo. **J Immunol**, v. 169, n. 7, p. 3914-9, Oct 2002. ISSN 0022-1767.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 819-26, Oct 2007. ISSN 1476-4687.

MERAD, M. et al. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. **Annu Rev Immunol**, v. 31, p. 563-604, 2013. ISSN 1545-3278.

MOREFIELD, G. L. et al. Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro. **Vaccine**, v. 23, n. 13, p. 1588-95, Feb 2005. ISSN 0264-410X.

MOSCA, F. et al. Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 30, p. 10501-6, Jul 2008. ISSN 1091-6490.

MULLIGAN, M. J. et al. Serological responses to an avian influenza A/H7N9 vaccine mixed at the point-of-use with MF59 adjuvant: a randomized clinical trial. **JAMA**, v. 312, n. 14, p. 1409-19, Oct 2014. ISSN 1538-3598.

MURPHY, B. R. et al. Secretory and systemic immunological response in children infected with live attenuated influenza A virus vaccines. **Infect Immun**, v. 36, n. 3, p. 1102-8, Jun 1982. ISSN 0019-9567.

NISHIYA, T.; DEFRANCO, A. L. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. **J Biol Chem**, v. 279, n. 18, p. 19008-17, Apr 2004. ISSN 0021-9258.

O'HAGAN, D. T. et al. The history of MF59(®) adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. **Expert Rev Vaccines**, v. 12, n. 1, p. 13-30, Jan 2013. ISSN 1744-8395.

OH, J. Z. et al. TLR5-mediated sensing of gut microbiota is necessary for antibody responses to seasonal influenza vaccination. **Immunity**, v. 41, n. 3, p. 478-92, Sep 2014. ISSN 1097-

4180.

OH, S.; EICHELBERGER, M. C. Polarization of allogeneic T-cell responses by influenza virus-infected dendritic cells. **J Virol**, v. 74, n. 17, p. 7738-44, Sep 2000. ISSN 0022-538X.

OTT, G. et al. MF59. Design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines. **Pharm Biotechnol**, v. 6, p. 277-96, 1995. ISSN 1078-0467.

PANG, I. K.; IWASAKI, A. Inflammasomes as mediators of immunity against influenza virus. **Trends Immunol**, v. 32, n. 1, p. 34-41, Jan 2011. ISSN 1471-4981.

PRECIOSO, A. R. et al. A phase I randomized, double-blind, controlled trial of 2009 influenza A (H1N1) inactivated monovalent vaccines with different adjuvant systems. **Vaccine**, v. 29, n. 48, p. 8974-81, Nov 2011. ISSN 1873-2518.

PREVENTION, C. O. D. C. A. **Vaccine adjuvants in Vaccine safety** 2018.

QUINTILIO, W. et al. Bordetella pertussis monophosphoryl lipid A as adjuvant for inactivated split virion influenza vaccine in mice. **Vaccine**, v. 27, n. 31, p. 4219-24, Jun 2009. ISSN 1873-2518.

RAMOS, H. C.; RUMBO, M.; SIRARD, J. C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. **Trends Microbiol**, v. 12, n. 11, p. 509-17, Nov 2004. ISSN 0966-842X.

RIETSCHER, E. T. et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **FASEB J**, v. 8, n. 2, p. 217-25, Feb 1994. ISSN 0892-6638.

ROSSI, M.; YOUNG, J. W. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. **J Immunol**, v. 175, n. 3, p. 1373-81, Aug 2005. ISSN 0022-1767.

ROTHBARTH, P. H. et al. Influenza virus serology--a comparative study. **J Virol Methods**, v. 78, n. 1-2, p. 163-9, Mar 1999. ISSN 0166-0934.

SAUTER, N. K. et al. Hemagglutinins from two influenza virus variants bind to sialic acid derivatives with millimolar dissociation constants: a 500-MHz proton nuclear magnetic resonance study. **Biochemistry**, v. 28, n. 21, p. 8388-96, Oct 1989. ISSN 0006-2960.

SAÚDE, M. D. Orientação dos grupos de risco. Disponível em: <
<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/influenza>>.
Acesso em: 01/2018.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, M. D. S. D. B. **Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 52 de 2017** 2018.

SEUBERT, A. et al. Adjuvant activity of the oil-in-water emulsion MF59 is independent of Nlrp3 inflammasome but requires the adaptor protein MyD88. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 27, p. 11169-74, Jul 2011. ISSN 1091-6490.

_____. The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. **J Immunol**, v. 180, n. 8, p. 5402-12, Apr 2008. ISSN 0022-1767.

SKEHEL, J. J.; WILEY, D. C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. **Annu Rev Biochem**, v. 69, p. 531-69, 2000. ISSN 0066-4154.

SKOUNTZOU, I. et al. Salmonella flagellins are potent adjuvants for intranasally administered whole inactivated influenza vaccine. **Vaccine**, v. 28, n. 24, p. 4103-12, May 2010. ISSN 1873-2518.

SMITH, K. D. et al. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. **Nat Immunol**, v. 4, n. 12, p. 1247-53, Dec 2003. ISSN 1529-2908.

SONG, L. et al. Mucosal and Systemic Immune Responses to Influenza H7N9 Antigen HA1-2 Co-Delivered Intranasally with Flagellin or Polyethyleneimine in Mice and Chickens. **Front Immunol**, v. 8, p. 326, 2017. ISSN 1664-3224.

STRUTT, T. M. et al. Memory CD4+ T cells induce innate responses independently of pathogen. **Nat Med**, v. 16, n. 5, p. 558-64, 1p following 564, May 2010. ISSN 1546-170X.

STUART-HARRIS, C. H. **Epidemiology of influenza in man**. *British Medical Bulletin* 1979.

SUBBARAO, K.; JOSEPH, T. Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 4, p. 267-78, Apr 2007. ISSN 1474-1733.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 335-76, 2003. ISSN 0732-0582. >.

TAKEMOTO, D. K.; SKEHEL, J. J.; WILEY, D. C. A surface plasmon resonance assay for the binding of influenza virus hemagglutinin to its sialic acid receptor. **Virology**, v. 217, n. 2, p. 452-8, Mar 1996. ISSN 0042-6822.

TATE, M. D. et al. Reassessing the role of the NLRP3 inflammasome during pathogenic influenza A virus infection via temporal inhibition. **Sci Rep**, v. 6, p. 27912, Jun 2016. ISSN 2045-2322.

TO, K. K. et al. The emergence of influenza A H7N9 in human beings 16 years after influenza A H5N1: a tale of two cities. **Lancet Infect Dis**, v. 13, n. 9, p. 809-21, Sep 2013. ISSN 1474-4457.

TRITTO, E.; MOSCA, F.; DE GREGORIO, E. Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. **Vaccine**, v. 27, n. 25-26, p. 3331-4, May 2009. ISSN 0264-410X.

UNIPROT. UniProtKB - P06179 (FLIC_SALTY). Disponível em: <
<http://www.uniprot.org/uniprot/P06179>>.

UYEKI, T. M.; COX, N. J. Global concerns regarding novel influenza A (H7N9) virus infections. **N Engl J Med**, v. 368, n. 20, p. 1862-4, May 2013. ISSN 1533-4406.

VAN FURTH, R. et al. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. **Bull World Health Organ**, v. 46, n. 6, p. 845-52, 1972. ISSN 0042-9686.

VESIKARI, T. et al. Enhanced immunogenicity of seasonal influenza vaccines in young children using MF59 adjuvant. **Pediatr Infect Dis J**, v. 28, n. 7, p. 563-71, Jul 2009. ISSN 1532-0987.

VILLADANGOS, J. A.; YOUNG, L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. **Immunity**, v. 29, n. 3, p. 352-61, Sep 2008. ISSN 1097-4180.

VONO, M. et al. The adjuvant MF59 induces ATP release from muscle that potentiates response to vaccination. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 52, p. 21095-100, Dec 2013. ISSN 1091-6490.

WEBSTER, R. G.; LAVER, W. G.; TUMOVA, B. Studies on the origin of pandemic influenza viruses V. Persistence of Asian influenza virus hemagglutinin (H2) antigen in nature? **Virology**, v. 67, n. 2, p. 534-43, Oct 1975. ISSN 0042-6822.

WEIS, W. et al. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. **Nature**, v. 333, n. 6172, p. 426-31, Jun 1988. ISSN 0028-0836.

WHO. World Health Organization risk assessment of human infection with avian influenza A(H7N9) virus. online, 2014. Disponível em: < http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/Influenza_Summary_IRA_HA_interface_27June14.pdf >. Acesso em: 13/11/2015.

WHO, W. H. O. **Global Alert and Response (GAR). Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS)** 2014.

_____. **Influenza at the human-animal interface**. 2017.

WHO. Influenza Laboratory Surveillance Information by the Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS). 2018. Disponível em: < <http://apps.who.int/flumart/Default?ReportNo=10> >.

WILEY, D. C.; SKEHEL, J. J. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. **Annu Rev Biochem**, v. 56, p. 365-94, 1987. ISSN 0066-4154.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. **Manual on Animal Diagnosis and Surveillance** 2002.

ANEXOS

ANEXO A – Lista de Anticorpos

Catálogo	Lote	Anticorpo	Fluoróforo	Clone	Empresa
561039	4287761	CD11b	APCCy7	M1/70	BD
560596	6232647	LY6C	APCCy7	AL-21	BD
552051	4101671	CD4	APCCy7	GK1.5	BD
560600	3270714	LY6G	APCCy7	1A8	BD
558079	4286714	CD11c	Pecy7	HL3	BD
25-0381-82	E17535-102	CD38	Pecy7	90	eBioscience
560569	5307563	CD44	Pecy7	IM7	BD
560516	4115576	CD25	Pecy7	MEL-14	BD
25-4801-82	4281123	F480	Pecy7	BM8	eBioscience
561100	4157645	CD3	Pecy7	145-2C11	
560528	4153647	CD80	Percepcy5	16-10A1	BD
551001	4346515	CD19	Percepcy5	1D3	BD
553036	83026	CD8	Percep	53-6.7	BD
550993	7363	CD11b	Percepcy5	M1/70	BD
553135	3319858	CD44	PECy5	im7	BD
553067	41109	CD3	Percep	145-2C11	BD
141708	B190966	CD206	APC	C068C2	BioLegend
561529	4094746	GL7	ALEXA 647	GL7	BD
564175	6287861	CD127	APC	SB/199	BD
550261	4245	CD11c	APC	HL3	BD
560016	5323879	CD80	APC	16-10A1	BD
558703	4076926	CD86	APC	GL1	BD
564008	5089509	CD3	BV421	17A2	BD
557000	4136998	IAIE	PE	M5/114.15.2 (M5/114)	BD
553090	62210	CD45R/B220	PE	RA3-6B2	BD
553151	4133611	CD62L	PE	MEL-14	BD
553032	22354	CD8	PE	53-6.7	BD
553691	3217925	CD86	FITC	GL1	BD
53-4801-82	E08863-1634	F480	AF488	BM8	eBioscience
564424	5224938	CD25	BB515	PC61	BD
553623	14781	IAIE	FITC	2G9	BD
553729	7834	CD4	FITC	GK1.5	BD
564454	4195837	CD11b	BB515	M1/70	BD
562891	5267725	CD4	BV421	GK1.5	BD
562605	5093970	CD11b	BV421	M1/70	BD
563898	5152815	CD8	BV421	53-6.7	BD

562737	5183861	LY6G	BV421	1A8	BD
563077	5128549	CD86	BV510	GL1	BD
562949	5217852	CD11c	BV510	HL3	BD

ANEXO B – Estratégias de Análise de Citometria de Fluxo

Células Inflamatórias

Célula Dendrítica Plasmocitóide

Linfócito T CD4 efetor