MARCELA APARECIDA BORDENALLI

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DA SÍLICA SBA-15 A ANTÍGENOS DE *SALMONELLA*
NA IMUNIZAÇÃO ORAL DE CAMUNDONGOS SELECIONADOS PARA ALTA E
BAIXA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

SÃO PAULO
2016

MARCELA APARECIDA BORDENALLI

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DA SÍLICA SBA-15 A ANTÍGENOS DE *SALMONELLA* NA
IMUNIZAÇÃO ORAL DE CAMUNDONGOS SELECIONADOS PARA ALTA E BAIXA
PRODUÇÃO DE ANTICORPOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Milene Tino De Franco

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

SÃO PAULO
2016

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

© reprodução parcial

Bordenalli, Marcela Aparecida.

Efeito da associação da sílica SBA-15 a antígenos de Salmonella na imunização oral de camundongos selecionados para alta e baixa produção de anticorpos / Marcela Aparecida Bordenalli. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Milene Tino De Franco.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Adjuvantes e vacinas.

Versão do título para o inglês: The antibody production after oral immunization of mice selected for high and low antibody response to LPS and flagellin antigens in the nanostructured sílica SBA-15.

1. Vacinas orais 2. Adjuvantes 3. Flagelina 4. Lipopolissacarídeo 5. SBA-15 6. Salmonella typhimurium I. Franco, Milene Tino de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB084/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Marcela Aparecida Bordenalli.

Título da Efeito da associação da sílica SBA-15 a antígenos de
Salmonella na imunização oral de camundongos
selecionados para alta e baixa produção de anticorpos.

Orientador(a): Milene Tino De Franco.

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:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

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 "Efeito da associação da sílica SBA-15 a antígenos de *Salmonella* na imunização oral de camundongos selecionados para alta e baixa produção de anticorpos", protocolo nº 1154/13, sob a responsabilidade de Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant'Anna e Marcela Aparecida Bordenalli - 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 9/10/2013.

Vigência do Projeto: 11/2013 - 07/2016	Nº de animais/espécie
Laboratório de Imunoquímica / Imunogenética	48 camundongos HighIII 2m (M,F), 48 camundongos LowIII 2m (M,F)

São Paulo, 9 de outubro de 2013

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

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 "Efeito da associação da sílica SBA-15 a antígenos de *Salmonella* na imunização oral de camundongos selecionados para alta e baixa produção de anticorpos", protocolo nº 1154/13, sob a responsabilidade de Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant'Anna e Marcela Aparecida Bordenalli - 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.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie	Observação
11/2013 - 07/2016 Laboratório de Imunoquímica / Imunogenética	48 Camundongos isogênicos HighIII 2m (M,F), 48 Camundongos isogênicos LowIII 2m (M,F), 84 Camundongos heterogênicos HighIII (M,F) - Adicional, 84 Camundongos heterogênicos LowIII (M,F) - Adicional	Adicional de animais

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 "Efeito da associação da sílica SBA-15 a antígenos de Salmonella na imunização oral de camundongos selecionados para alta e baixa produção de anticorpos", **protocolo nº 1154/13**, sob a responsabilidade de Milene Tino De Franco e Marcela Aparecida Bordenalli - 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 20/4/2016.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie	Observação
11/2013 - 07/2016 Laboratório de Imunogenética	36 Camundongos Balb/c - Procedentes do Laboratório de Imunogenética	Aditivo de animais

São Paulo, 25 de abril de 2016

Dr. José Ricardo Jensen
Coordenador da CEUAIB

Aos meus pais Marilda e Reinaldo, a minha
irmã Vanessa e ao Diogo por todo apoio,
carinho e amor!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me permitir chegar até aqui.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas, que me cobrem de amor e carinho, me ensinaram a ser honesta, a não desistir e lutar pelos meus sonhos.

A minha irmã, grande amiga, parceira e cúmplice. Você é meu espelho de mulher batalhadora.

Ao meu namorado Diogo, pelas palavras doces que sempre me traziam alegria quando eu insistia em desanimar.

A minha orientadora Dra. Milene Tino De Franco, pela amizade, parceria, confiança e aprendizado de todos esses anos. Obrigada por ter sido sempre tão legal e compreensiva comigo!

Ao Dr. Osvaldo Augusto Sant'Anna, pela generosidade, pela disposição a ajudar de todas as formas possíveis e por fornecer a sílica SBA-15 para a realização deste trabalho. O Sr. é um dos responsáveis por grande parte dos meus conhecimentos científicos. Obrigada.

A Dra. Wafa Koury Cabrera, por toda ajuda nas imunizações dos animais e por ter sido sempre tão gentil e prestativa.

A Dra. Solange Carbonare e Aryene Trezena, por todo apoio e ótimas sugestões durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Orlando Garcia Ribeiro, pela ajuda na análise do experimento de citometria de fluxo e por ter permitido o desenvolvimento do meu projeto no Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan.

A Dra. Nancy Starobinas, pelo fornecimento dos animais High e Low.

Ao Dr. Luis Carlos Ferreira e Dra. Juliana Falcão do Departamento de Microbiologia do ICB-USP, pelo fornecimento da flagelina utilizada neste trabalho.

A Dra. Marcia Fantini do Instituto de Física, pela realização do ensaio de SAXS.

A Tamíris Guidugli, por ter me ajudado no experimento de citometria de fluxo.

Aos funcionários do biotério do Laboratório de Imunogenética, por terem cuidado bem dos meus camundongos.

As funcionárias do Laboratório de Imunogenética, Tania e Neusa, pela preparação dos materiais e pela amizade.

Aos pesquisadores e alunas do Laboratório de Imunogenética, pela convivência agradável durante esses anos.

As minhas queridas amigas Tatiane Canhamero, Mara Irineu, Jussara Gonçalves e Mara Correa, por todos esses anos de amizade e risadas. Vocês são lindas e merecem toda a felicidade do mundo!

As minhas amadas amigas de faculdade, Isa Lima, Iara Camargo, Adriana Mezini, Tamires Feitosa, Amanda Pitteri e Amanda Karine, pelos dez anos de amizade verdadeira. Obrigada por torcerem por mim!

Aos meus amigos Thiago Oliveira, Thalita Araujo, Aline Teixeira, Andrews Krupinski, Katie Riciluca, Giovana Salustiano, Bruno Yamamoto e Luis Guilherme Virgilho. Vocês são demais!

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

*“beija
flor
na chuva*

*gota
alguma
derruba”*

(Paulo Leminski)

RESUMO

BORDENALLI, M.A. **Efeito da associação da sílica SBA-15 a antígenos de *Salmonella* na imunização oral de camundongos selecionados para alta e baixa produção de anticorpos.** 2016. 67 f. Dissertação de Mestrado (Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A sílica mesoporosa SBA-15 é uma forte candidata para uso como adjuvante por apresentar propriedades vantajosas, como a capacidade de integração com moléculas, baixa toxicidade, boa estabilidade química, térmica e hidrotérmica. Seu potencial adjuvante foi demonstrado em trabalhos onde a SBA-15, associada a antígenos de naturezas distintas, foi capaz de induzir uma alta produção de anticorpos específicos quando administrados por via parenteral. Os efeitos da SBA-15 na produção de anticorpos com imunizações realizadas exclusivamente pela via oral não havia sido testada. Assim, foi estudado a produção de anticorpos, tipos celulares no linfonodo mesentérico e produção de citocinas em camundongos heterogênicos selecionados para alta (H_{III}) e baixa (L_{III}) produção de anticorpos e em animais de fundo genético conhecido (BALB/c), após imunização oral com dois antígenos de naturezas distintas: LPS (antígeno T-independente) e flagelina (antígeno T-dependente), associados à sílica SBA-15. Os camundongos foram inoculados com duas doses de LPS ou flagelina de *Salmonella typhimurium*, associados ou não a SBA-15, pela via oral ou por via subcutânea. Os animais de todas as linhagens apresentaram IgG anti-LPS e anti-flagelina no soro, em todos os períodos estudados. Porém, diferenças significativas entre grupos imunizados com antígeno associado ou não com SBA-15 só foram encontradas nos animais BALB/c imunizados com flagelina, após reforço oral. Não foram detectadas IgA nem SIgA nos soros nem nos lavados intestinais de nenhum animal nos períodos estudados. Dentre os tipos de células caracterizadas nos linfonodos mesentéricos dos animais (células B1a, B1b, T auxiliares, T citotóxicas e células dendríticas), observou-se apenas um aumento de células dendríticas nos animais H_{III} imunizados com LPS e SBA-15 comparados com os animais que receberam somente LPS. Nesse modelo de estudo não foi possível demonstrar a ação adjuvante da sílica SBA-15 na imunização oral. Outros parâmetros, tais como o aumento do número de doses de reforço, outras doses antígenos, além de estudos com antígenos que sejam menos comuns à mucosa intestinal podem ser úteis para analisar um eventual efeito adjuvante da sílica SBA-15 na imunização oral.

Palavras-chave: Vacinas orais. Adjuvantes. Flagelina. Lipopolissacarídeo. SBA-15. *Salmonella typhimurium*

ABSTRACT

BORDENALLI, M.A. **Effect of SBA-15 silica in association with *Salmonella* antigens in oral immunization of mice selected for high and low antibody production.** 2016. 67p. Master Thesis (Biotechnology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Ordered mesoporous silica SBA-15 is a strong vaccine adjuvant candidate because of its advantageous properties such as the ability to associate with molecules, low toxicity, and also good chemical, thermal and hydrothermal stability. It has been demonstrated that the association of SBA-15 with several antigens, including toxins, induces high production of specific antibodies when injected parenterally. Nevertheless it is not yet completely known the effect of the oral administration of antigen-associated -SBA-15 in the specific antibody response. In this work we studied the antibody level production, cell subsets in the mesenteric lymph nodes and cytokine production in mice genetically selected for high (H_{III}) and low (L_{III}) production of antibodies and BALB/c mice, orally immunized with *Salmonella* typhimurium LPS (T-independent antigen) or flagellin (T-dependent antigen) associated or not to SBA-15. Mice were inoculated twice, by oral or subcutaneous route. The animals of all lineage produced anti-LPS and anti-flagellin IgG in all periods. Significant differences between groups immunized with antigen associated or not to SBA-15 were only found in BALB/c mice immunized with flagellin after oral booster in different immunization schedules. We could not detect any seric or secretory IgA in animal sera or intestinal lavage. Among the cell types characterized in flow cytometry (B1a, B1b, helper T, cytotoxic T cells and dendritic cells) there was only an increase of dendritic cells in the lymph nodes of the animals H_{III} immunized with LPS and SBA-15 compared to animals that received LPS only. In this study model, it was not possible to demonstrate an adjuvant effect of silica SBA-15 after oral immunization. Other parameters such as increased number of booster doses, other antigen doses and studies with use of antigens which are less common to intestinal mucosa could be useful to analyze a possible adjuvant effect of silica SBA-15 in oral immunization.

Keywords: Oral vaccines. Adjuvants. Flagellin. Lipopolysaccharide. SBA-15. *Salmonella typhimurium*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	23
Figura 2 -Esquema ilustrativo dos componentes do sistema imune de mucosas no intestino.....	26
Figura 3- Esquemas dos experimentos de imunização.....	34
Figura 4- Porcentagem de adsorção da flagelina pela SBA-15.....	39
Figura 5- Produção de IgG anti-LPS em camundongos High ^{III} e Low ^{III} imunizados pela via oral (esquema 1).....	40
Figura 6- Produção de IgG anti-LPS em camundongos High ^{III} , Low ^{III} e BALB/c imunizados pela via oral (esquema 2).....	42
Figura 7- Produção de IgM anti-flagelina em camundongos BALB/c imunizados pela via oral (esquema 2).....	43
Figura 8- Produção de IgG anti-flagelina em camundongos High ^{III} , Low ^{III} e BALB/c imunizados pela via oral (esquema 2).....	44
Figura 9- Produção de IgM anti-LPS em camundongos High ^{III} e BALB/c imunizados pela via oral e subcutânea (esquema 3).....	45
Figura 10- Produção de IgG anti-LPS em camundongos High ^{III} , Low ^{III} e BALB/c imunizados pela via oral e subcutânea (esquema 3).....	46
Figura 11- Produção de IgG anti-flagelina em camundongos High ^{III} , Low ^{III} e BALB/c imunizados pela via oral e subcutânea (esquema 3).....	48
Figura 12- Pesquisa de linfócitos B-1, por citometria de fluxo, no linfonodo mesentérico de camundongos H ^{III} e L ^{III}	51
Figura 13- Pesquisa de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ , por citometria de fluxo, no linfonodo mesentérico de camundongos H ^{III} e L ^{III}	52
Figura 14- Pesquisa das moléculas CD80 e CD86, por citometria de fluxo, em células obtidas do linfonodo mesentérico de camundongos H ^{III} e L ^{III}	53
Figura 15- Pesquisa de células dendríticas, por citometria de fluxo, no linfonodo mesentérico de camundongos H ^{III} e L ^{III}	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Anticorpos Monoclonais utilizados no experimento de citometria de fluxo.....	37
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AIF	Adjuvante incompleto de Freud
AL(OH)₃	Hidróxido de Alumínio
APC	Célula apresentadora de antígeno
APC	Aloficocianina (fluorocromo)
BSA	Soroalbumina bovina
CARD	<i>Caspase activation and recruitment domain</i>
CT	Toxina colérica
DO	Densidade ótica
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FAE	Epitélio associado ao folículo
FITC	Isotiocianato de Fluoreceína (fluorocromo)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HP	Vírus do papiloma humano
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobilina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-12	Interleucina 12
IL-5	Interleucina5
IL-6	Interleucina6
IL-18	Interleucina 18
Int1βr	Intimina1 β recombinante
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MALT	Tecido linfóide associado à mucosa
GALT	Tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal
MHC	Complexo principal de histocompatibilidadede
NLR	<i>Nod-like receptor</i>
OPD	Orto-dihidrocloreto de fenilediamina
PAMP	Padrões Moleculares Associados à Patógenos
PE	Ficoeritrina (fluorocromo)

PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrão
PBS	Tampão salina-fosfato
SAXS	<i>Small Angle X-Ray Scattering</i>
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
SIM	Sistema imune de mucosa
TED	Dendritos transepiteliais
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TLR	Receptor do tipo toll
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
IL-1β	Interleucina1 β
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
OVA	Ovalbumina
LP	Lamina própria
RNA	Ácido ribonucleico
NLRP	Família de NLR contendo o domínio pirina
NLRC	Família de NLR contendo o domínio CARD
CEUAIB	Comissão de ética no uso de animais do Instituto Butantan
SFB	Soro fetal bovino
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
DC	Célula dendrítica
PerCP	Proteína clorofila peridinina (fluorocromo)
DL50	Dose letal mediana
NF-κB	Fator nuclear κ B

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Vacinas orais	19
1.2 Adjuvantes.....	20
1.3 Linhagens de camundongos High ^{III} e Low ^{III}	21
1.4 Sílica Nanoestruturada SBA-15.....	22
1.5 Tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal.....	24
1.6 LPS e flagelina de <i>Salmonella typhimurium</i>	28
2 OBJETIVO.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Animais.....	31
3.2 Sílica mesoporosa nanoestruturada.....	31
3.3 LPS e flagelina de <i>Salmonella Typhimurium</i>	31
3.4 Análise do potencial de encapsulação/ adsorção do antígeno pela SBA-15.....	31
3.5 Preparo do inóculo.....	32
3.6 Imunização com LPS e flagelina	32
3.7 Coleta de sangue.....	35
3.8 Coleta de Lavado intestinal.....	35
3.9 Determinação dos títulos de anticorpos.....	35
3.10 Quantificação de citocinas	36
3.11 Citometria de Fluxo	37
3.11.1 Obtenção de células do linfonodo mesentérico	37
3.12 Análise estatística	38
4 RESULTADOS.....	39
4.1 Verificação da capacidade de encapsulação da SBA-15.....	39
4.2 Efeito da sílica SBA-15 na produção de IgM e IgG séricas anti-LPS em animais imunizados pela via oral (Experimento 1)	40
4.3 Efeito da sílica SBA-15 na produção de IgM e IgG séricas anti-LPS em animais imunizados pela via oral (Experimento 2)	41
4.4 Efeito da sílica SBA-15 na produção de IgM e IgG séricas anti-flagelina em animais imunizados pela via oral (Experimento 2)	43

4.5 Efeito da sílica SBA-15 na produção de IgM e IgG séricas anti-LPS em animais imunizados pela via oral (Experimento 3)	45
4.6 Efeito da sílica SBA-15 na produção de IgM e IgG séricas anti-flagelina em animais imunizados pela via oral (Experimento 3)	47
4.7 Produção de IgA sérica e secretória	49
4.8 Quantificação de citocinas presente no soro	49
4.9 Análise da fenotipagem das células do linfonodo mesentérico por citometria de fluxo	50
5 DISCUSSÃO.....	55
6 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vacinas orais

A vacinação é uma das principais conquistas da saúde pública e o método mais eficaz na prevenção de doenças infecciosas, por isso é crescente a busca pelo desenvolvimento de novas vacinas economicamente viáveis, mais eficazes e de efeito duradouro.

As superfícies mucosas são as principais vias de entrada de patógenos (KIYONO, AZEGAMI; 2015), por isso, o desenvolvimento de vacinas orais eficazes reduziria consideravelmente o número de doenças infecciosas.

As vacinas orais tem se tornado um dos principais alvos de pesquisa por apresentarem características vantajosas como a redução de custos, a diminuição de efeitos colaterais, facilidade de administração, a possibilidade de imunizar um grande número de pessoas e menor desconforto físico (SCARAMUZI, 2013). Porém, alguns fatores dificultam a construção de vacinas orais eficazes. A administração oral de antígenos proteicos sem adjuvantes, por exemplo, não é capaz de estimular respostas de mucosa específicas eficientes, devido ao ambiente hostil do trato gastrointestinal que, além de possuir mecanismos de depuração (ação peristáltica e secreção de muco), contam com ácidos gástricos e enzimas digestivas que podem degradar os antígenos, alterando seus epítomos, e assim prejudicar sua imunogenicidade. Além disso, parte da vacina administrada por via oral é eliminada nas fezes, diminuindo o tempo de exposição do antígeno na mucosa (SHALABY, 1995).

Atualmente, a maioria das vacinas disponíveis para uso em humanos é administrada por via parenteral, que é eficaz na indução de respostas imunológicas sistêmicas, mas pouco indutora de resposta imune específica para patógenos de mucosa. Por outro lado, a vacinação de mucosa com veículos de distribuição apropriados ou co-administrada com adjuvante induz com sucesso tanto respostas sistêmicas como específicas de mucosa, o que torna a vacinação oral um instrumento valioso na proteção contra inúmeros patógenos (AZEGAMI, 2014).

Uma vacina oral eficaz deve ser facilmente internalizada na mucosa e ser capaz de estimular resposta efetora específica, como a produção de células B de memória, células T e respostas de anticorpos de longa duração (HOWE;

KONJUFCA, 2015). A resposta de anticorpos locais, produzidos por essa via de imunização, pode ser determinante para conferir proteção contra patógenos das mucosas, como o vírus do papiloma humano (HPV), vírus da imunodeficiência humana (HIV), rotavírus, norovírus, *Mycobacterium spp* e outros (HERREMANS et al., 1999).

1.2 Adjuvantes

O termo adjuvante originou-se da palavra em latim *adjuvare* que significa ajudar (COX; COUTER, 1997; GUPTA; SIBER, 1995; SCARAMUZZI, 2009). São substâncias que tem a função de aumentar a imunogenicidade do antígeno, e assim potencializar o efeito da vacina induzindo respostas imunes específicas duradouras (GUPTA; SIBER, 1995). Além disso, são utilizados para reduzir a dose de antígeno necessária para gerar uma resposta protetora e eficaz (GALLIHER-BECKLEY et al., 2015).

O interesse em desenvolver adjuvantes é antigo. Em 1925¹ e 1926², Ramon apud Mota (2006) demonstrou que adicionando ágar, sais metálicos, óleo, lectina ou saponina às vacinas era possível aumentar os níveis de anticorpos contra toxinas tetânica e diftérica. Desde então, os adjuvantes têm recebido grande atenção.

O hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) é o adjuvante mais comumente utilizado, é considerado seguro e atualmente compõe várias vacinas veterinárias e humanas. No entanto, estudos recentes demonstraram ineficácia do $\text{Al}(\text{OH})_3$ para vacinas contra diversos patógenos (ALVING et al., 2012). É estimulador de fortes respostas do tipo $\text{T}_\text{H}2$ estimulando secreção principalmente de IL-4 e IL-5 e baixas respostas $\text{T}_\text{H}1$, o que faz do $\text{Al}(\text{OH})_3$ um adjuvante pouco eficaz contra doenças virais e bactérias intracelulares (COX; COUTER, 1997). Além disso, pode causar alguns efeitos colaterais, como nódulos subcutâneos, eritema, inflamação granulomatosa e hipersensibilidade de contato, pois tende a induzir uma grande quantidade de macrófagos e neutrófilos para o local de administração (GOTO et al., 1997). Ainda, atraem eosinófilos, estimulando a produção de IgE e consequentemente aumentando o surgimento de doenças alérgicas (COGNE et al., 1985).

¹RAMON, G. Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de sérum antidiftérique. **Bulletin de la Société Central de Médecine Vétérinaire**, v. 101, p. 227-234, 1925.

²RAMON, G. Procédure pour accroître la production des antitoxines. **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 40, p. 1-10, 1926.

Os adjuvantes podem atuar em cinco caminhos: (1) imunomodulação, que se refere à capacidade de regulação do sistema imunológico através de modificação na rede de citocinas secretadas e inibidas; (2) apresentação, que se refere à capacidade de manter a integridade do antígeno e apresentá-lo as células efectoras, e como consequência, estimular a produção duradoura de anticorpos neutralizantes; (3) indução de linfócitos T citotóxicos, facilitando a incorporação ou persistência de peptídeos apropriados dentro do complexo principal de histocompatibilidade classe 1 (MHC I); (4) liberação ou entrega do antígeno, que se refere à capacidade de liberar o antígeno para as células apresentadoras de antígeno; (5) efeito depósito, que possibilita a liberação do antígeno por curto ou longo prazo (COX; COULTER, 1997).

1.3 Linhagens de camundongos High^{III} e Low^{III}

As linhagens de camundongos High e Low foram obtidas através seleção genética bidirecional para bons e maus produtores de anticorpos a partir de acasalamentos não consangüíneos entre quatro colônias de camundongos Swiss. A seleção genética bidirecional permitiu, após gerações, o acumulo e fixação dos genes envolvidos no efeito de alta e baixa produção de anticorpos, assim, atingindo a separação fenotípica máxima entre as linhagens (BIOZZI et al., 1979).

A seleção I foi obtida considerando-se a resposta primária a eritrócito de carneiro e de pombo, em gerações alternadas (BIOZZI et al., 1979). Na seleção II considerou-se a resposta primária a eritrócito de carneiro, mas aguardando um longo período para a imunização das gerações consecutivas (FIENGOLD et al., 1976). Em 1976, Siqueira e colaboradores, selecionaram camundongos considerando a resposta secundária a antígenos flagelares (seleção III) e somáticos (seleção IV) de *Salmonella typhimurium* e *Salmonella oranienburg*. A partir de uma população F2 da seleção IV, a IV-A foi obtida considerando a resposta secundária a eritrócito de carneiro (CABRERA et al., 1982). Na seleção V considerou-se a resposta secundária a soroalbumina bovina e gamaglobulina de coelho (PASSOS et al., 1977).

Em todas as linhagens, as diferenças entre High e Low não se limitam apenas ao antígeno utilizado no processo de seleção. Porém, esse efeito de resposta multiespecífico foi mais intenso nas linhagens I e III (BIOZZI et al., 1979; SIQUEIRA et al., 1977).

Alguns trabalhos foram realizados para melhor compreender os mecanismos envolvidos na resposta imunológica dessas linhagens.

Sbrogioet al. (2004) demonstrou em seu trabalho a diferença na produção de anticorpos entre as linhagens High_{III} (H_{III}) e Low_{III} (L_{III}) após imunizações oral e intraperitoneal com *Salmonella typhimurium* ou *Samonella* Dublin. Verificou que os animais selecionados para alta produção de anticorpos (H_{III}) apresentaram títulos superiores quando comparados com L_{III}.

Aguera (1982) e Carvalhães et al. (1986) demonstraram em seus trabalhos que a linhagem H_{III} é mais resistente a infecção parasitária pelo *Schistosoma mansoni* e fungica pelo *Paracoccidioide Brasiliensis*. Maior resistência nessa linhagem também foi observada contra *toxoplasma gondii* (SIQUEIRA et al., 1985) e pelo vírus da raiva (DE FRANCO et al., 1996).

Em relação às células TCD4+, TCD8+ e linfócitos B nos linfonodos, H_{III} e L_{III} não apresentam diferenças basais (REIS et al., 1989), assim como também não há diferença na atividade macrofágica entre as linhagens (REIS te al., 1992). Entretanto, no decorrer de uma inflamação, os H_{III} possuem linfócitos B com capacidade maior de ativação, apresentação de antígenos e, conseqüentemente, produzem quantidades maiores de anticorpos (DE FRANCO et al., 1996; SANT'ANNA et al., 1982).

Os camundongos H_{III}, tratados com pristane, substância utilizada para indução de artrite experimental, apresentam quantidades maiores de linfócitos T regs que a linhagem L_{III}(ROSSATO, 2011). Ainda, os H_{III}, produzem quantidades maiores de citocinas IL-1, TNF- α e IL-6 após inoculação de LPS de *Salmonella typhimurium* (TREZENA et al., 2002)

1.4 Sílica Nanoestruturada SBA-15

As sílicas mesoporosas nanoestruturadas são partículas de óxido de silício com estrutura organizada que permite sua integração com átomos, íons e moléculas. Possui propriedades muito atraentes, como boa estabilidade química, térmica, hidrotérmica, mecânica e baixa toxicidade (KRESGE et al., 1992; MATOS et al., 2001; YANG, 1997).

A SBA-15 foi descrita em 1998, e desde então, tem ganhado importância nos estudos de nanotecnologia. Esse material é sintetizado em meio ácido utilizando um copolímero tribloco, o poli-(óxido de etileno – poli-(óxido de propileno) – poli-(óxido de etileno) ($\text{EO}_{20}\text{PO}_{70}\text{EO}_{20}$) responsável pela organização da polimerização de espécies de silicato que formam a sílica SBA-15 (MATOS et al., 2001; ZHAO et al., 1998).

Figura 1 -Sílica mesoporosanoestruturada SBA-15. (A) Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM). (B) Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM). Tamanho médio da partícula: $30\mu\text{m}$.
Fonte: (SCARAMUZZI et al., 2011)

Nos últimos anos diversas formulações de adjuvantes foram desenvolvidas, mas poucas foram testadas clinicamente e a maioria nunca foi aceita para a vacinação devido à toxicidade e os efeitos colaterais.

Há diversos trabalhos que utilizaram a sílica SBA-15 como um veículo de entrega de drogas como betametasona (GHASEMNEJAD et al., 2015) acetaminofeno, progesterona, e estavudina (GORDON et al., 2015) e ibuprofeno e heparina (WAN et al., 2016), mas sua capacidade de transportar e liberar imunógenos, ativando eficientemente o sistema imunológico, ainda não havia sido testada. Foi no laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan que se iniciamos estudos com esse material a fim de investigar sua capacidade de atuar como adjuvante de vacinas.

No primeiro estudo, em 2006, Mercuri et al. verificou que camundongos BALB/c e camundongos geneticamente selecionados pra baixa produção de anticorpos (L_{III}), imunizados pela via subcutânea com Intimina 1β recombinante

(*Int1βr*) de *Escherichia coli* com veneno total de serpente (*Micrurus Ibiboboca*), encapsulados a SBA-15, tiveram aumento significativo de anticorpos em comparação com os animais que receberam os mesmos antígenos em adjuvante incompleto de Freud (AIF) ou $\text{Al}(\text{OH})_3$. Ainda nesse trabalho, foi possível verificar uma melhor indução de memória com a sílica mesoporosa SBA-15. Resultados semelhantes foram obtidos por Carvalho et al. (2010) onde a sílica também aumentou a resposta de anticorpos em camundongos L_{III} e L_{IV} após imunização com soro albumina bovina (BSA) por via oral e intramuscular, sem grande alteração em H_{III} e H_{IV} . O efeito adjuvante da SBA-15 também foi demonstrado no trabalho de Scaramuzzi (2011) onde camundongos BALB/c apresentaram títulos altos de SIgA e IgG1 após serem imunizados por via oral ou subcutânea com proteína recombinante do vírus de hepatite B (HBsAg) adsorvida em sílica. Ainda nesse trabalho, foi demonstrado que, ao contrário do $\text{Al}(\text{OH})_3$ que estimula principalmente resposta T_{H2} e pouca indução de respostas mediadas por células, a sílica nanoestruturada SBA-15 permite o desenvolvimento de uma resposta imune equilibrada, eficiente e específica. Kupferschmidt e colaboradores (2014), também demonstraram o efeito adjuvante da sílica SBA-15, onde camundongos BALB/C imunizados pela via subcutânea com ovoalbumina (OVA) associada à SBA-15 apresentaram níveis maiores de IgG1 quando comparados aos grupos imunizados com OVA+ $\text{Al}(\text{OH})_3$.

Além dos trabalhos que demonstraram seu potencial como adjuvante, a SBA-15 foi capaz de diminuir a toxicidade da toxina diftérica na imunização de cavalos (comunicação pessoal).

Considerando esses resultados, a sílica SBA-15 mostra-se como um grande potencial para atuar como um adjuvante de mucosa.

1.5 Tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal

A superfície mucosa funciona como primeira linha de defesa contra patógenos e representa o maior órgão linfóide do corpo. O sistema imune de mucosa (SIM) é dividido em dois componentes principais: tecido linfóide associado à mucosa (MALT), onde a resposta antígeno específica se inicia; e lâmina própria (LP), que é o local da fase efetora da resposta imune adaptativa (WANG, et al., 2014).

O sistema imune de mucosa possui características imunológicas complexas que o torna único frente ao sistema imune sistêmico (WANG et al., 2012).

O tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal (GALT) inclui as placas de Peyer e os folículos linfóides e tem papel importante na resposta antígeno-específica no intestino. É uma rede integrada de tecidos, células linfóides e não linfóides e moléculas efetoras, incluindo os anticorpos, quimiocinas e citocinas que atuam na resposta a patógenos invasores e antígenos entregues durante a vacinação (LAMICHHANE et al., 2014).

A imunidade humoral no intestino é caracterizada principalmente pela grande produção de IgA e pequenas quantidades de IgM e IgG. A IgA secretada é transportada através das células epiteliais para o interior do lúmen intestinal. Esses anticorpos são capazes de neutralizar microrganismos e toxinas, impedindo sua interação às células do hospedeiro.

As placas de Peyer são as estruturas mais relevantes do GALT com distribuição irregular ao longo do intestino delgado. Constituem um centro germinativo contendo linfócitos B, células T auxiliares (CD4⁺), células T reguladoras, células dendríticas foliculares e macrófagos. São sítios indutores onde a maioria das respostas de IgA são iniciadas. As placas de Peyer atuam principalmente na captura de bactérias e vírus são cobertas pelo epitélio associado ao folículo (FAE) que abriga as células M (SHIMA et al., 2014). As células T presentes na lâmina própria e a região intraepitelial do intestino parecem também derivar das placas de Peyer (BUENO; PACHECO-SILVA, 1999).

As células M possuem microvilosidade reduzida, alta atividade de endocitose, glicocalix fino, lisossomos dispersos e bolsas basolaterais contendo fagócitos mononucleares e linfócitos (WANG et al., 2012). Sua principal função é transportar, através da barreira epitelial, diferentes substâncias do lúmen intestinal para as células apresentadoras de antígenos (APCs), como as células dendríticas, que fazem a apresentação pelo MHC classe I ou II para as células T (SHIMA et al., 2014).

As células dendríticas podem capturar antígenos do lúmen intestinal através da projeção de dendritos entre as células epiteliais, chamados dendritos transepiteliais (TEDs). Elas interagem com linfócitos T e B ou migram para os linfonodos mesentéricos onde farão a apresentação dos antígenos proteicos para as

células T virgens, para a geração de células T antígeno-específicas, incluindo T_H1 , T_H2 , T_H17 e células T citotóxicas, sendo que esse processo ocorre sob influência de receptores de quimiocinas, especialmente o CCR7 (Figura 2) (MCNAMEE et al., 2014).

Nos linfonodos mesentéricos, local onde ocorre a coleta de antígenos trazidos pela linfa dos intestinos, ocorre também a diferenciação de células B virgens em células secretoras de anticorpos, como plasmócitos secretores de IgA, e o desenvolvimento de células T efetoras e T reguladoras. As células que se diferenciam nos linfonodos geralmente vão posteriormente residir na lâmina própria.

Figura 2 -Esquema ilustrativo dos componentes do sistema imune de mucosas no intestino.
Fonte: (ABBAS et al., 2011).

Os linfócitos B1 são componentes essenciais no sistema imune de mucosas, e são ativados por diferentes ligantes bacterianos e virais, sem a necessidade de sinais co-estimuladores e de outros fatores imunológicos. Essa capacidade permite proteção rápida contra agentes patogênicos. A interação precoce dessas células com antígenos resulta na produção de anticorpos IgG e IgA (MARTIN et al., 2001). São subclassificados em B-1a e B-1b. As células B-1a oferecem proteção contra infecções bacterianas, enquanto a B-1b responde principalmente a antígenos

T- independentes, mas independentemente do tipo de antígeno, funciona como a primeira fonte de anticorpos (MARTIN et al., 2001)

O epitélio mucoso produz substâncias e abriga tipos celulares como células dendríticas e macrófagos, que são capazes de montar respostas antivirais e anti-inflamatórias, induzidas principalmente pelo Receptor de Reconhecimento de Padrão (PRR), após o reconhecimento de PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) (AKHMATOVA et al., 2014)

Os PRR, entre eles os chamados *Toll-like receptors* (TLR), reconhecem uma variedade de PAMPs de microrganismos patogênicos. Existem nove TLRs funcionais em humanos, denominados TLR1 ao TLR9. Os ligantes reconhecidos pelos TLR são diversos e incluem produtos de todas as classes de microrganismo, como por exemplo LPS, ácido lipoteicoico e flagelina. Também são ligantes de TLR produtos virais, como RNA de fita dupla e RNA de fita simples, e polissacarídeos ricos em manoses, presentes em fungos. Esses receptores estão presentes em vários tipos celulares como, leucócitos, células epiteliais, endoteliais e musculares, e sua sinalização pode levar à ativação de vários fatores de transcrição como NF- κ B (Fator nuclear kappa B) e IRFs (Fator regulatório de Interferon), como IRF-3, IRF-5 e IRF-7. O NF- κ B estimula muitas das moléculas necessárias às respostas inflamatórias, como citocinas inflamatórias (TNF e IL-1), quimiocinas (CCL2) e moléculas de adesão endotelial. Os IRFs também promovem a produção de citocinas inflamatórias, além de interferons do tipo α e β , importantes para o desenvolvimento de resposta inata antivirais. Ainda, a ativação de TLR tem como resultado o aumento de expressão de moléculas coestimulatórias (KAISHO; AKIRA, 2006).

Além dos TLR, os *Nod-like receptors* (NLR) também são capazes de reconhecer PAMP de agentes patogênicos. Mas ao contrário dos TLRs, os NLRs são sensores presentes no citoplasma que sinalizam em resposta a patógenos intracelulares. São encontrados em células imunológicas, inflamatórias e barreiras epiteliais. Os receptores NLR podem ser classificados de acordo com os domínios efetores que iniciam a sinalização, chamados NLRB (NLR contendo domínio BIR), NLRCs (NLR contendo o domínio CARD), e NLRP (NLRs contendo o domínio Pirina) (LAGE et al., 2014; SELLIN et al., 2015).

As moléculas NOD-1 e 2, da subfamília de NLR que contém domínio CARD, são expressas no citoplasma de diversos tipos celulares, e parecem ser muito

importantes para a resposta imunológica inata contra patógenos do trato gastrointestinal. NOD-1 reconhece principalmente substâncias derivadas de bactérias gram-negativas, enquanto NOD-2 reconhece muramil dipeptídeo, molécula presente em bactérias gram-negativas e gram-positivas (MOTTA et al., 2015).

Os receptores NLRs respondem aos PAMPs através da formação de uma plataforma composta por um complexo de proteínas, chamado inflamassoma.

Após uma década da descoberta do inflamassoma, pouco se sabe sobre o complexo molecular formado pelos NLRs. Acredita-se na existência de inflamassomas distintos, cada um liderado por uma proteína chave da família dos NLRs (BOYDEN et al., 2006). Dentre os complexos conhecidos, os inflamassomas NLRP3 e NLRC4 são os mais estudados e melhor caracterizados. São capazes de ativar caspases inflamatórias, como a caspase-1, responsável pela secreção das citocinas IL-1 β e IL-18. A importância desses complexos na resposta contra doenças bacterianas, virais, fúngicas e infecções por protozoários e suas influências em processos inflamatórios estão ganhando destaque na literatura (LAGE et al., 2014).

1.6 LPS e flagelina de *Salmonella typhimurium*

O LPS é o principal componente da membrana externa de bactérias gram-negativas e é constituído de um lipídio complexo ligado a um polissacarídeo (RIETSCHEL et al., 1994; SWEET; HUME, 1996). É um antígeno denominado timo-independente (T- independente), pois induz a produção de anticorpos sem o auxílio das células T, uma vez que não são apresentados através de moléculas do MHC.

A administração de LPS ativa principalmente, monócitos e macrófagos através da ligação com o TLR4. Durante anos acreditou-se que o TLR4 era o único responsável pelas respostas induzidas por LPS. No entanto, diversos estudos vêm mostrando a capacidade do LPS como ativador do inflamassoma NLRP3 (KAGAN, 2013).

A flagelina é o componente principal do filamento, uma das três estruturas do flagelo bacteriano, e devido sua importância na patogenicidade de bactérias, tem sido alvo de muitos estudos. Além de ser ativadora do sistema inato, estimula também o sistema adaptativo, e por isso tem se tornado grande alvo de pesquisas para o desenvolvimento de vacinas (DATTA et al., 2003). A flagelina

é um antígeno proteico T dependente, ou seja, a produção de anticorpos ocorre na presença de células T auxiliares, são processados e apresentados pelo MHC.

A flagelina extracelular é reconhecida pelo TLR5, mas pode ser entregue ao citosol celular através do sistema de secreção tipo III, presente em bactérias virulentas, como a *Salmonella typhimurium*. No citosol celular, a flagelina é capaz de ativar inflamassoma NLRC4 independente de TLR5. (LAGE et al., 2014).

Considerando as vantagens da vacinação oral, os bons resultados obtidos nos trabalhos realizados com a SBA-15 e que as linhagens H_{III} e L_{III} são bons modelos experimentais para o estudo de produção de anticorpos, este trabalho tem como finalidade investigar se diferentes classes de antígenos (T independente e T dependente), associados à sílica, apresentam imunogenicidade aumentada quando administrados por via oral.

Nossa hipótese é que os antígenos ligados à sílica estariam protegidos durante a passagem pelo estômago e seriam mais bem apresentados, gerando uma resposta imune mais consistente, tanto para antígenos T dependentes como para T independentes.

2 OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi analisar a propriedade adjuvante da sílica nanoestruturada quando administrada por via oral em camundongos em associação a dois tipos de antígenos, o LPS (T independente) e a flagelina de *Salmonella typhimurium* (T dependente).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

O efeito adjuvante da SBA-15 foi avaliado em camundongos heterogênicos High^{III} e Low^{III}, machos e fêmeas, criados e fornecidos pelo biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, e camundongos isogênicos BALB/c, fêmeas, criados e fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan, todos de dois meses de idade.

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB).

3.2 Sílica mesoporosa nanoestruturada

As partículas de sílica foram sintetizadas no Instituto de Química da USP pelos Dra Lucildes P. Mercuri e Dr. Jivaldo R. Matos e cedidas gentilmente pelo Dr. Osvaldo Augusto Sant'anna do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan.

3.3 LPS e flagelina de *Salmonella typhimurium*

Foi utilizado neste trabalho LPS de *Salmonella typhimurium* comercial (cod. 6511- *Sigma-Aldrich* Biotechnology Co., St Louis, MO, EUA).

A flagelina rFliC_i - recombinante de *Salmonella typhimurium* -purificada utilizada para a imunização dos camundongos foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira (Professor titular do Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biomédicas – USP).

3.4 Análise do potencial de encapsulação/ adsorção do antígeno pela SBA-15

O potencial de encapsulação da SBA-15 foi determinada usando-se diferentes proporções de flagelina:SBA-15 (1:2, 1:5, 1:10, 1:20) ressuspensas em PBS, num volume final de 1mL.

Os tubos contendo as preparações foram mantidos por 18 horas a 4°C. No dia seguinte, o material foi centrifugado a 1500 rpm por 3 minutos e a concentração de proteína não adsorvida pela sílica foi determinada no sobrenadante utilizando Kit BCA (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, EUA).

Como controle, utilizou-se suspensão de SBA-15 ou solução de flagelina nas mesmas concentrações acima, em volume final de 1mL.

Para avaliar a encapsulação do LPS pela SBA-15, foi preparado uma suspensão na diluição 1:10 de LPS:SBA-15 que foi gentilmente testada pela Dra. Marcia C. A. Fantini do Instituto de Física da USP, utilizando a técnica de SAXS (*Small Angle X-Ray Scattering*). O teste de SAXS é uma técnica de raios-x a baixo ângulo usada para determinar a estrutura de um sistema de partículas, em micro ou nano escala.

3.5 Preparo do inóculo

O LPS e a SBA-15 foram diluídos em PBS pH 7,4, e a flagelina em Tampão Tris-Cálcio (Tris 0,1M NaCl 0,5M).

A preparação do inóculo de LPS seguiu o protocolo descrito por Carvalho et al. (2010), com pequenas modificações. O complexo imunogênico foi preparado na proporção 1:10 (LPS:SBA-15) em PBS pH 7,4, em tubos com fundo redondo e mantidos, na vertical, por 18 horas a 4°C. O inóculo de Flagelina seguiu o mesmo protocolo, porém utilizando Tampão Tris-Cálcio (Tris 0,1M NaCl 0,5M) para sua preparação.

3.6 Imunização com LPS e Flagelina

Para a avaliação do efeito adjuvante da sílica SBA-15, foram feitos três esquemas de imunização (figura 3). Os dois primeiros experimentos (esquemas 1 e 2) foram realizados exclusivamente por via oral, e o terceiro (esquema 3) com a primeira administração via oral e reforço subcutâneo, conforme descritos a seguir:

Experimento 1 – Imunização por via oral com reforço via oral (intervalo de 75 dias)

Nesse primeiro experimento de imunização, foram utilizados camundongos H_{III} e L_{III} [n=4 a 8/grupo]. Cada animal recebeu duas doses de 75µg de LPS por gavagem, adsorvidos ou não a SBA-15, na proporção de 1:10 (ag:SBA-15), num volume final de 0,2mL de PBS.

Experimento 2 – Imunização por via oral com reforço via oral (intervalo de 30 dias)

Cada camundongo das linhagens H_{III}, L_{III} e BALB/c [n=6/grupo] recebeu por via oral 75µg ou 50µg de LPS ou flagelina, respectivamente, adsorvidos ou não a SBA-15, na proporção de 1:10 (ag:SBA-15), num volume final de 0,2mL de PBS.

Para avaliar a resposta secundária, os animais receberam um reforço por gavagem no 30º dia.

Experimento 3 – Imunização por via oral com reforço subcutâneo (intervalo de 30 dias)

Neste ultimo experimento, os camundongos H_{III}, L_{III} [n=5/grupo] e BALB/c [n=3/grupo] receberam a primeira imunização oral nas mesmas condições dos esquemas anteriores. Para a avaliação da resposta secundária, os animais receberam um reforço no 30º dia pela via subcutânea, nas concentrações de 7,5µg ou 5µg/animal de LPS ou flagelina, respectivamente, adsorvidos ou não a SBA-15, na proporção de 1:10 (ag:SBA-15), num volume final de 0,2mL de PBS.

Nos três experimentos os grupos controles receberam PBS ou SBA-15.

Antes das imunizações orais os camundongos foram privados de água e ração por 2 horas.

Figura 3- Esquemas dos experimentos de imunização

(A) Experimento 1- Camundongos H_{III} e L_{III} receberam duas doses por via oral, com intervalo de 75 dias, com 75µg de LPS encapsulados ou não a SBA-15. Após 15 dias de cada imunização, foram coletados sangue e lavado intestinal para dosagem de IgM, IgG, IgA e SIgA. **(B) Experimento 2-** Camundongos H_{III}, L_{III} e BALB/c receberam duas doses por via oral, com intervalo de 30 dias, com 75µg de LPS ou 50µg de flagelina, encapsulados/adsorvidos ou não a SBA-15. O sangue foi coletado 8 horas após a primeira inoculação, para investigação de IL-1β, IL-6 e IL-12, e nos dias 0, 7 e 37 para investigação de IgM, IgG e IgA. O lavado intestinal foi coletado no dia 37 para investigação de SIgA. **(C) Experimento 3-** Camundongos H_{III}, L_{III} e BALB/c receberam por via oral 75µg de LPS ou 50µg de flagelina, encapsulados/adsorvidos ou não a SBA-15. Após 30 dias, receberam reforço subcutâneo com 7,5µg de LPS ou 5µg de flagelina, encapsulados/adsorvidos ou não a SBA-15. O sangue foi coletado nos dias 0, 7 e 37 para investigação de IgM, IgG e IgA. O lavado intestinal foi coletado no dia 37 para investigação de SIgA.

3.7 Coleta de sangue

As coletas de sangue foram realizadas através do plexo retro-orbital nos dias 15 e 90 (experimento 1) e nos dias 0, 7 e 37 (experimentos 2 e 3). Foram retirados cerca de 100 a 200µL de sangue de cada animal. O soro foi obtido após coagulação do sangue e centrifugação por 10 minutos a 2000rpm. O sobrenadante foi separado e mantido a -20°C até o uso.

3.8 Coleta de Lavado intestinal

Para a coleta do lavado intestinal, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e 10cm da porção mediana do intestino delgado de cada animal foram retirados. Com o auxílio de um cateter intravenoso os fragmentos de intestinos foram lavados com 2mL de tampão PBS contendo 1% de Albumina Bovina (BSA, *Sigma-Aldrich* Biotechnology Co., St Louis, MO, EUA) e 1% de PMSF 100mM. Todo o conteúdo coletado do intestino foi mantido no gelo e centrifugado a 2000rpm por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados a -80°C até o uso.

No experimento 1 de imunização, as coletas foram realizadas no 15º e 90º dia. Nos experimentos 2 e 3 as coletas foram realizadas no dia 37.

3.9 Determinação dos títulos de anticorpos

Os soros e os lavados intestinais coletados foram analisados pelo teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para a determinação de anticorpos IgG, IgM, IgA e SIgA.

Utilizou-se microplacas com 96 poços sensibilizadas com 10µg/mL de LPS ou flagelina diluídos em tampão PBS pH 7,4 ou Carbonato-Bicarbonato(0,05M Na₂CO₃ 0,05M NaHCO₃), respectivamente, por 18 horas a 4°C. Após essa incubação inicial, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão PBS contendo 0,05% de tween-20 (PBS-tween). As placas foram bloqueadas com SFB (Soro fetal bovino) 10% em PBS por 60 minutos em temperatura ambiente. Depois de um novo ciclo de lavagens com PBS-tween, as amostras de soro foram diluídas em série em tampão de diluição

(PBS-SFB 5% - tween 0,05%), distribuídas nos poços e incubadas por 90 minutos a 37°C. As placas foram lavadas 50µL por poço dos anticorpos anti-IgG (1:1000 para LPS ou 1:2000 para flagelina), anti-IgM (1:1000) e anti-IgA (1:500) marcados com peroxidase foram adicionados. Após incubação de 90 minutos a 37°C, as placas foram lavadas e adicionou-se 50µL de substrato (10mg de OPD diluído em 25mL de tampão Citrato-Fosfato pH5,0 – 0,1M ácido cítrico; fosfato de sódio bifásico 0,2M/ H₂O₂) 0,3%) por 30 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. As reações foram interrompidas com 25µL de ácido sulfúrico 2,5N e a DO lida em leitor (MicroQuantBio-Tek) com filtro 490nm. Os resultados foram expressos em títulos, definidos como o inverso da diluição correspondente a uma DO de 0,5.

3.10 Quantificação de citocinas

A quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-12 foi feita nos soros coletados após 8 horas da imunização oral com LPS ou flagelina (Experimento 2), adsorvidos ou não a SBA-15. O ensaio de ELISA foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).

Utilizou-se placa de 96 poços sensibilizada com 50µL do primeiro anticorpo diluído em tampão Carbonato-Bicarbonato por 18 horas a 4°C. No dia seguinte, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-Tween 0,05% e bloqueada com 100µL de PBS contendo 20% de SFB por 2 horas a temperatura ambiente. Após ciclo de 3 lavagens, 50µL das citocinas recombinantes (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) ou das amostras diluídas em PBS-SFB 10% foram distribuídas nos poços e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas 6 vezes e 50µL do segundo anticorpo (biotinilado) foram adicionados e incubados por mais 1 hora a temperatura ambiente. Depois de um novo ciclo de lavagens as placas foram incubadas por 30 minutos com 50µL de estreptoavidina marcada com peroxidase. O substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina – BD Biosciences) foi adicionado nos poços após 6 lavagens. A reação foi interrompida com 25µL de ácido sulfúrico 2,5N. As leituras foram feitas no leitor (MicroQuantBio-Tek, Winooski, Vermont, EUA) em DO 450nm.

3.11 Citometria de Fluxo

3.11.1 Obtenção de células do linfonodo mesentérico

Os linfonodos mesentéricos de camundongos H_{III} e L_{III} foram retirados após 3 dias de imunização por via oral com LPS (75µg) ou flagelina (50µg), adsorvidos ou não a SBA-15 (n=3). Depois da retirada, foram macerados e as suspensões celulares foram centrifugadas a 1500rpm por 15 minutos a 4°C. Os pellets foram ressuspenso em PBS acrescido de 2% de SFB [PBS-SFB] e as células contadas em câmara de malassez.

Em placa de 96 poços, 100µL da suspensão celular (1.10⁶/mL) foram distribuídos nos orifícios e 30µL de FCblock foram adicionados por 10 minutos a 4°C no escuro. Após lavagem com 100µL de PBS-SFB a 1200 rpm por 5 minutos a 4°C, 25µL da diluição de cada anticorpo monoclonal foram adicionados por 30 minutos a 4°C no escuro. Após duas lavagens com PBS-SFB, o pellet foi ressuspenso em 200µL PBS-SFB. O conteúdo de cada poço foi transferido para tubos de poliestileno de fundo redondo e lido em seguida no Citômetro de Fluxo (FacsCanto – BD Bioscience, San Jose, CA, EUA). As análises foram feitas no software FloJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA).

Tabela 1 - Anticorpos Monoclonais utilizados no experimento de citometria de fluxo

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Fabricante
CD5	APC	53-7.3	eBioscience
CD19	PerCP Cy5.5	1D3	eBioscience
CD23	FITC	B3B4	Pharmingen
CD11b	APC	Mi/70	Pharmingen
CD11c	PE	HL3	Pharmingen
F4/80	FITC	BM8	eBioscience
CD4	FITC	GK1.5	Pharmingen
CD8	PE	53-6.7	Pharmingen
CD80	FITC	16-10 A1	Pharmingen
CD86	PE	GL1	Pharmingen

3.12 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do ANOVA (teste Tukey). Foram consideradas diferenças significantes quando o valor de p foi $<0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Verificação da capacidade de encapsulação dos antígenos pela SBA-15

O teste SAXS revelou que a SBA-15 teve os nanoporos preenchidos pelo LPS quando utilizado na proporção 1/10.

Para analisar o potencial de encapsulação da SBA-15, foram feitos experimentos *in vitro* utilizando quatro proporções de flagelina:SBA-15 (1:2, 1:5, 1:10 e 1:20) diluídas em PBS pH 7,4. Os materiais foram incubados por 18 horas e a concentração de proteína não encapsulada foi dosada no sobrenadante utilizando Kit BCA.

Na figura 4, é possível verificar que há uma correlação entre a proporção da sílica SBA-15 e a capacidade de adsorção do antígeno, ou seja, quanto mais sílica no meio, maior é a porcentagem de antígeno adsorvido. A flagelina, uma proteína de aproximadamente 50kDa, teve 64,8% de encapsulação na proporção 1:2, 71,3% na 1:5, 74% na 1:10 e 75,3% na 1:20. Optamos por usar nas imunizações a proporção 1:10, pois a diferença em relação a proporção mais alta (1:20) é mínima e menos sílica seria utilizada para a preparação do inóculo.

Figura 4- Porcentagem de adsorção da flagelina pela SBA-15

Adsorção/encapsulação da flagelina pela SBA-15 foi determinada usando-se diferentes proporções de flagelina:SBA-15 (1:2, 1:5, 1:10, 1:20) ressuspensas em PBS.

4.2 Efeito da sílica SBA-15 na produção de IgM e IgG séricas anti-LPS em animais imunizados pela via oral com SBA-15 (Experimento 1)

Para verificar se a imunização oral com e sem sílica é capaz de induzir a produção de anticorpos IgM e IgG anti-LPS, os camundongos receberam por via oral, duas doses de 75µg de LPS, adsorvido ou não a sílica.

Não foi possível detectar níveis de IgM anti-LPS em nenhum dos períodos avaliados nem de IgG no período de 15 dias (dados não mostrados).

Em relação à produção de IgG no período de 90 dias, observou-se níveis semelhantes nos soros dos grupos experimentais e controles, em ambas as linhagens, sem diferenças estatísticas. Os grupos controles apresentaram grande variação individual, sendo que alguns animais possuíam níveis de anticorpos maiores que os grupos imunizados.

Figura 5- Produção de IgG anti-LPS em camundongos High^{III} e Low^{III} imunizados pela via oral (esquema 1).

Títulos de IgG anti-LPS produzidos por camundongos H^{III} (A) e L^{III} (B) obtidos após 90 dias da primeira imunização pela via oral com LPS encapsulado ou não a SBA-15.

4.3 Efeito da sílica SBA-15 na produção de IgM e IgG séricas anti-LPS em animais imunizados pela via oral (Experimento 2)

Não foi possível detectar IgM anti-LPS em nenhum dos períodos avaliados.

Sobre a produção de IgG, os grupos apresentaram níveis baixos de anticorpos, semelhantes aos grupos controles, em 7 e 37 dias, sem diferenças estatísticas entre os grupos experimentais LPS e LPS+SBA-15.

Observou-se um aumento discreto nos níveis de IgG nos soros de 37 dias quando comparados aos soros coletados no período de 7 dias.

Figura 6- Produção de IgG anti-LPS em camundongos High^{III}, Low^{III} e BALB/c imunizados pela via oral (esquema 2).

Títulos de IgG anti-LPS produzidos por camundongos H^{III} (A e B), L^{III} (C e D) e BALB/c (E e F) imunizados exclusivamente pela via oral (Experimento 2). Dosagem de anticorpos realizada 7 dias após cada imunização oral com LPS encapsulado ou não a SBA-15.

4.4 Efeito da sílica SBA-15 na produção de IgM e IgG séricas anti-flagelina em animais imunizados pela via oral (Experimento 2)

Sobre a produção de IgM específica contra flagelina, observou-se uma pequena diferença estatística ($p < 0,05$) somente em camundongos BALB/c, entre os grupos Fla+SBA-15 e o controle salina (figura 7). Nas linhagens HIII e LIII não houve resposta.

Figura 7- Produção de IgM anti-flagelina em camundongos BALB/c imunizados pela via oral (esquema 2).

Títulos de IgM anti-flagelina produzidos por camundongos BALB/c imunizados exclusivamente pela via oral (Experimento 2). Dosagem de anticorpos realizada 7 dias após o reforço por via oral com flagelina encapsulada/adsorvida ou não a SBA-15. * $p < 0,05$.

Nos soros de 7 dias, os níveis de IgG dos grupos experimentais estão semelhantes aos controles.

Na avaliação da resposta secundária, foram encontradas diferenças significativas na linhagem BALB/c entre os grupos Fla+SBA-15 e Fla ($p < 0,05$), Fla+SBA-15 e salina ($p < 0,01$) e Fla+SBA-15 e SBA-15 ($p < 0,01$) (figura 8F).

Figura 8- Produção de IgG anti-flagelina em camundongos High^{III}, Low^{III} e BALB/c imunizados pela via oral (esquema 2).

Títulos de IgG anti-flagelina produzidos por camundongos H^{III} (A e B), L^{III} (C e D) e BALB/c (E e F) imunizados exclusivamente pela via oral (Experimento 2). Dosagem de anticorpos realizada 7 dias após cada imunização oral com flagelina encapsulada/adsorvida ou não a SBA-15. *p<0,05; **p<0,01.

4.5 Efeito da sílica SBA-15 na produção de IgM e IgG séricas anti-LPS em animais imunizados pela via oral e subcutânea (Experimento 3)

Foi possível detectar níveis baixos de IgM específica apenas nas linhagens H_{III} (figura 9A) e BALB/c (figura 9B). Há um aumento discreto na produção dos grupos LPS e LPS+SBA-15, mas sem diferenças significativas em relação aos controles.

Figura 9- Produção de IgM anti-LPS em camundongos High_{III} e BALB/c imunizados pela via oral e subcutânea (esquema 3).

Títulos de IgM anti-LPS produzidos por camundongos H_{III} (A) e BALB/c (B) obtidos após 7 dias do reforço subcutâneo com LPS encapsulado ou não a SBA-15.

Na avaliação da resposta secundária, os animais permaneceram com níveis baixos de IgG. Houve uma pequena diferença estatística na linhagem L_{III} entre os grupos LPS+SBA-15 e o controle de SBA-15 (figura 10D). Ainda, observou-se maior variação individual na linhagem H_{III}, aos 37 dias, nos grupos LPS e LPS+SBA-15, em comparação as demais linhagens.

Figura 10- Produção de IgG anti-LPS em camundongos High^{III}, Low^{III} e BALB/c imunizados pela via oral e subcutânea (esquema 3).

Títulos de IgG anti-LPS produzidos por camundongos H^{III} (A e B), L^{III} (C e D) e BALB/c (E e F) imunizados pela via oral com reforço subcutâneo (Experimento 3). Dosagem de anticorpos realizada 7 dias após cada imunização com LPS encapsulado ou não a SBA-15. * $p < 0,05$.

4.6 Efeito da sílica SBA-15 na produção de IgM e IgG séricas anti-flagelina em animais imunizados pela via oral e subcutânea (Experimento 3)

Não houve níveis de IgM detectáveis nos períodos avaliados.

Nos soros coletados 7 dias após a primeira imunização foram detectados níveis baixos de IgG nas linhagens estudadas. Observou-se uma pequena diferença estatística na linhagem L_{III}, entre os grupos controle SBA-15 e Flagelina ($p < 0,05$) (figura 11C).

Após o reforço subcutâneo, para avaliação da resposta secundária, houve aumento significativo dos níveis de IgG, na linhagem L_{III}, nos grupos Fla e Fla+SBA-15 ($p < 0,001$) (figura 11D).

Figura 11- Produção de IgG anti-flagelina em camundongos High^{III}, Low^{III} e BALB/c imunizados pela via oral e subcutânea (esquema 3).

Títulos de IgG anti-flagelina produzidos por camundongos H^{III} (A e B), L^{III} (C e D) e BALB/c (E e F) imunizados pela via oral com reforço subcutâneo (Experimento 3). Dosagem de anticorpos realizada 7 dias após cada imunização com flagelina encapsulada/adsorvida ou não a SBA-15. *p<0,05; ***p<0,001.

4.7 Produção de IgA sérica e secretória

Para verificar a produção de IgA sérica e secretória específica, foram coletados amostras de soro e lavado intestinal.

No primeiro experimento (Experimento1), as coletas ocorreram 15 dias após as inoculações. Já nos experimentos 2 e 3 as coletas de soro foi realizada 7 dias após as gavagens, e o lavado intestinal coletado no final do experimento.

Não houve IgA específica detectável em amostras de soro e do lavado intestinal. No entanto, para descartar uma possível degradação do material ou problemas no ensaio de ELISA, foi realizado um teste para detecção de IgA total. Altos níveis de IgA inespecífica foram detectados nestas amostras (dados não mostrados), confirmando a preservação do material.

4.8 Quantificação de citocinas presente no soro

As citocinas IL1 β , IL6 e IL12 foram dosadas no soro coletado 8 horas após a primeira imunização (Experimento2).

Não foi possível detectar nenhuma das citocinas analisadas em qualquer amostra de soro.

4.9 Análise da fenotipagem das células do linfonodo mesentérico realizada por citometria de fluxo.

A fim de caracterizar os tipos celulares encontrados no linfonodo mesentérico, camundongos da linhagem High^{III} e Low^{III} receberam por via oral 75µg de LPS ou 50µg de flagelina, adsorvidos ou não a sílica SBA-15. Os linfonodos mesentéricos foram coletados após três dias e as células foram avaliadas quando a presença dos marcadores CD19, CD5, CD23, CD4, CD8, CD80, CD86, CD11c e CD11b.

Foram encontrados linfócitos B-1 dos subtipos B-1a e B-1b, descritos na literatura como CD19⁺CD5⁺CD23⁻ e CD19⁺CD5⁻CD23⁻, respectivamente. Em relação ao subtipo B-1a, houve uma pequena diferença significativa em Low^{III} entre os grupos Fla+SBA-15 e o controle de salina (figura 12A). Diferença semelhante encontrada também nos linfócitos B-1b em ambas as linhagens (figura 12C). Na figura 12D é possível observar diferenças muito significativas entre os grupos controle de SBA-15 e os demais, mostrando que a SBA-15 teve capacidade de estimular, sozinha, o recrutamento de linfócitos B-1b para os linfonodos mesentéricos.

Com relação aos linfócitos T CD4⁺ houve diferenças muito significativas em H^{III}, entre os grupos Fla, Fla+SBA-15 e o controle de salina (figura 13A). Novamente, foi possível observar nas figuras 13B e 13D diferenças muito significativas entre os grupos controle de SBA-15 e os demais. Sobre os linfócitos T CD8⁺, houve diferenças significativas em ambas as linhagens, entre os grupos Fla+SBA-15 e os controles de salina (figura 13C).

Houve baixo recrutamento de células expressando as moléculas coestimulatórias CD80 e CD86, apresentando diferenças significativas apenas de CD86, na linhagem L^{III}, entre os grupos Fla, Fla+SBA-15, SBA-15 e o controle de salina (figura 14C). Observou-se também, mais uma vez, a capacidade da SBA-15, sozinha, de estimular o recrutamento de células para os linfonodos mesentéricos (figura 14D).

Por fim, em relação às células dendríticas, na figura 15B, é possível observar uma diferença estatística em H^{III}, entre os grupos que receberam o LPS sozinho e LPS associado à sílica. Ainda nessa figura, novamente, houve diferenças significativas entre os grupos controle de SBA-15 e os demais.

Figura 12- Pesquisa de linfócitos B-1, por citometria de fluxo, no linfonodo mesentérico de camundongos H_{III} e L_{III}

Recrutamento de linfócitos B-1 no linfonodo mesentérico de camundongos H_{III} e L_{III} [n=3/grupo], após 3 dias da imunização oral com flagelina ou LPS encapsulados/adsorvidos ou não à sílica SBA-15. Foram analisados linfócitos B-1a (**A e B**) e B-1b(**C e D**). Os resultados são expressos em número total de células (células x 10⁶/mL), média ± SD. *p<0,05; ***p<0,001.

Figura 13- Pesquisa de linfócitos T CD4 e CD8, por citometria de fluxo, no linfonodo mesentérico de camundongos H_{III} e L_{III}

Linfócitos T CD4⁺ CD8⁻ (**A e B**) e T CD8⁺ CD4⁻ (**C e D**) no linfonodo mesentérico de camundongos H_{III} e L_{III} [n=3/grupo], após 3 dias da imunização oral com flagelina ou LPS encapsulados/adsorvidos ou não a sílica SBA-15. Os resultados são expressos em número total de células (células x 10⁶/mL), média ± SD. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Figura 14- Pesquisa das moléculas CD80 e CD86, por citometria de fluxo, em células obtidas do linfonodo mesentérico de camundongos H_{III} e L_{III}

Moléculas coestimulatórias CD80⁺ CD86⁻ (**A e B**) e CD86⁺ CD80⁻ (**C e D**) em células do linfonodo mesentérico de camundongos H_{III} e L_{III} [n=3/grupo], após 3 dias da imunização oral com flagelina ou LPS encapsulados/adsorvidos ou não a sílica SBA-15. Os resultados são expressos em número total de células (células x 10⁶/mL), média ± SD. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Figura 15- Pesquisa de células dendríticas, por citometria de fluxo, no linfonodo mesentérico de camundongos H_{III} e L_{III}

Recrutamento de células dendríticas CD11c⁺ CD11b⁻ F4/80⁻ no linfonodo mesentérico de camundongos H_{III} e L_{III} [n=3/grupo], após 3 dias da imunização oral com flagelina(**A**) ou LPS (**B**) encapsulados/adsorvidos ou não a sílica SBA-15. Os resultados são expressos em número total de células (células x 10⁶/mL), média ± SD. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

5 DISCUSSÃO

Considerando os resultados promissores dos trabalhos envolvendo a SBA-15 associada a antígenos de naturezas distintas, que demonstraram seu potencial adjuvante, partiu-se então para a investigação do seu efeito quando utilizada exclusivamente pela via oral.

Para o presente estudo foram escolhidos dois tipos de antígenos, LPS e flagelina, pelas ações descritas a seguir. Trabalhos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo mostraram que a SBA-15 potencializa o efeito tóxico de LPS quando administrado pelas vias intravenosa e peritoneal. Camundongos AIRmax Slc11a1^{R/S} susceptíveis ao choque endotóxico foram injetados com 50µg, 75µg ou 100µg de LPS de *Salmonella typhimurium*, adsorvidos ou não a sílica ou ao Hidróxido de Alumínio, por via intraperitoneal. Foram determinados os valores de DL₅₀: LPS= 139,65 µg; LPS+Sílica= 96,28 µg; LPS+Hidróxido de Alumínio= 118,71 µg, mostrando que o efeito deletério da endotoxina foi acentuado quando associada à sílica (dados não publicados). Talvez o efeito potencializador da toxicidade do LPS observado estivesse ligado à forma de apresentação do antígeno ao sistema imune, tornando o LPS uma escolha interessante para investigar a sua associação à sílica na imunização por via oral.

Em paralelo, a flagelina foi incluída no estudo por ter sido um dos antígenos selecionadores das linhagens H_{III} e L_{III} e por ser de natureza diferente, isto é, um antígeno T-dependente, em comparação ao LPS, que é um antígeno T-independente. Assim, pretendeu-se estudar se a Sílica SBA-15 poderia aumentar a produção de anticorpos e estimular diferentes tipos celulares quando associada a diferentes antígenos na imunização por via oral.

A escolha das linhagens H_{III} e L_{III} para o início do estudo baseou-se no fato de serem linhagens heterogêneas, que refletem uma população de indivíduos com padrões de respostas imunes diversas, mais adequadas para o estudo de vacinas. Além disso, a linhagem H_{III} é mais sensível que L_{III} à infecção de *S. typhimurium* (SANT'ANNA et al., 1989) e, indiretamente, mais sensível ao LPS, que desempenha um importante papel na infecção. A flagelina foi um dos antígenos selecionadores das linhagens H_{III} e L_{III}, o que também justificaria o uso desses animais.

A SBA-15 é sintetizada em meio ácido, por isso acredita-se que a passagem pelo trato gastrointestinal, que possui pH extremamente ácido, não interferiria na sua estabilidade e, conseqüentemente, não influenciaria na capacidade de proteção do antígeno contra a ação de proteases, mantendo sua imunogenicidade.

Devido sua estrutura altamente organizada e suas propriedades físico-químicas, a interação com moléculas podem ocorrer tanto na sua superfície como dentro dos seus nanoporos de aproximadamente 10nm de diâmetro (MATOS et al., 2001). As moléculas podem ser encapsuladas dentro dos nanoporos ou adsorvidas, mantendo-se na superfície da nanopartícula.

A porcentagem de adsorção do antígeno pode diminuir de acordo com o tamanho da molécula. O BSA tem cerca de 66kDa e, na proporção 1:10, apresenta 65,5% de encapsulação. Já a *Int1β* de massa molecular de 16,5kDa, tem 82% de encapsulação na proporção 1:10 (Carvalho, 2007).

Inicialmente foi demonstrado que os dois tipos de antígenos utilizados no trabalho, LPS (antígeno polissacarídeo T independente) e flagelina (antígeno proteico T dependente) foram incorporados pela sílica. O potencial de encapsulação do LPS pela SBA-15 foi analisado primeiramente pelo teste de “*Limulus Amebocyte Lysate*”. Os resultados obtidos foram inconclusivos (dados não mostrados), por isso, optou-se pela utilização do teste “SAXS”, que consiste de uma técnica de raio-X a baixo ângulo capaz de caracterizar uma nanopartícula quanto sua forma, tamanho, área e volume. O teste de SAXS revelou que a molécula de LPS é encapsulada nos nanoporos da SBA-15 (dados não mostrados).

As dosagens de proteínas realizadas nos sobrenadantes de preparações com diferentes proporções de flagelina:SBA-15, revelou que o antígeno foi incorporado a sílica nas diferentes preparações. O teste SAXS seria necessário para verificar se a flagelina é encapsulada e/ou adsorvida na sílica. No entanto, a quantidade de flagelina necessária para realizar o teste é grande, e devido à limitação de material não foi possível realizá-lo.

Nos trabalhos realizados com a SBA-15 que tiveram como estratégia de imunização inicial a via oral, o aumento expressivo na produção de anticorpos ocorreu após reforço subcutâneo. Ainda não havia sido testada a capacidade da SBA-15 de aumentar significativamente a produção de anticorpos com imunizações exclusivamente administradas pela via oral.

Antígenos T independentes como o LPS, podem estimular a produção de imunoglobulinas de baixa afinidade, na sua maioria IgM. Sem ativação de linfócitos T não ocorre mudança de classe e produção de linfócitos de memória. (CUNNINGHAM et al., 2014). É possível que a SBA-15 possa servir como um carreador de várias moléculas de LPSs, facilitando a apresentação de epitopos repetitivos e promovendo a estimulação de linfócitos B. Porém, não observou-se um aumento da produção de IgM significativamente em nenhum grupo de animais imunizados com LPS.

No caso da flagelina, temos um antígeno proteico T dependente. Os linfócitos T em cooperação com os linfócitos B reconhecem antígenos proteicos e estimulam a expansão clonal dos linfócitos B, a mudança de classe, de IgM para IgG, e a diferenciação em linfócitos de B de memória (JUNIOR et al., 2010). Neste caso houve produção de IgM anti-flagelina na linhagem BALB/c aos 37 dias, enquanto nas linhagens H_{III} e L_{III} não foi possível detectar resposta.

Inicialmente foi utilizado um esquema de imunização com longo período entre as duas doses (Experimento 1), baseado em trabalhos anteriores (CARVALHO, 2010). Pelos resultados pouco promissores que foram obtidos, sem diferenças significativas entre os grupos imunizados com e sem sílica, resolveu-se diminuir o tempo entre a primeira dose de vacinação e o reforço para 30 dias e as coletas de soro para sete dias após as imunizações (Experimento 2), pois a via de mucosa talvez necessitasse de um estímulo mais precoce. Além disso, devido à grande variação individual observada entre os animais, a linhagem isogênica BALB/c foi incluída com o objetivo de se buscar resultados mais homogêneos, e também por ter sido a linhagem utilizada nos trabalhos onde se observou o efeito adjuvante da SBA-15.

Considerando essa abordagem esperávamos que os antígenos associados à sílica fossem protegidos, seus epítomos mantidos íntegros e que isso fosse um fator para aumentar a resposta de anticorpos em relação à inoculação do antígeno puro, o que não aconteceu de maneira significativa em nenhum dos grupos estudados, com os dois tipos de antígeno.

No segundo experimento de imunização, que se utilizou um intervalo de 30 dias entre as doses orais, observou-se um nível maior de IgM anti-flagelina no grupo BALB/c que recebeu o antígeno com a SBA-15, em relação ao controle de salina. Na resposta secundária, a diferença observada na linhagem BALB/c entre os grupos

que receberam flagelina com e sem sílica, após reforço oral (figura 8F), não é representativa do grupo, pois se tratando de uma linhagem isogênica pode-se considerar que esse fenômeno ocorreu em apenas um indivíduo.

Talvez um sistema de imunizações consecutivas por via oral, com curtos períodos entre as doses, pudesse melhorar a produção de anticorpos anti-flagelina, uma vez que é mostrado na literatura que o sistema imune humoral da mucosa necessita de estímulos seguidos para responder de maneira significativa. Strindeli *et al.* (2004) mostrou em seu trabalho níveis altos de IgM e IgG após imunizações pela via oral em camundongos *C3H/HeJ*. As doses foram administradas três vezes consecutivas, uma a cada sete dias, durante três semanas, com 42 µg de flagelina sozinha ou conjugada com micropartículas de amido.

Nos animais primados pela via oral e com reforço subcutâneo (Experimento 3), também não foi possível encontrar diferenças entre os grupos imunizados com LPS ou flagelina, com e sem sílica. Observamos somente um aumento na resposta secundária de IgG anti-flagelina, nos grupos experimentais da linhagem *LIII* (figura 11D). Observou-se que a imunização induziu resposta, pois os níveis de IgG dos grupos controles estão significativamente menores.

A produção de IgM e IgG ocorre durante os dois tipos de respostas, primária e secundária, sendo que a quantidade IgM produzida durante a resposta secundária é menor. A IgM é a principal imunoglobulina produzida durante a resposta primária, mas sua produção diminui rapidamente. A IgG é produzida predominantemente durante a resposta secundária, e sua produção é persistente.

Observamos respostas inespecíficas, com produção de anticorpos anti-LPS nos controles. Por se tratar de um antígeno comum das bactérias gram-negativas presentes na microbiota intestinal, animais não *germ-free*, como os estudados neste trabalho, podem apresentar respostas naturais. Possivelmente, o uso de um polissacarídeo de uma bactéria menos comum diminuiria as respostas naturais observadas nos grupos controles. O que foi observado também foram grandes variações individuais dos camundongos quanto ao nível de anticorpos, que pode ser devido à heterogeneidade genética destas linhagens.

Os antígenos que entram em contato com o organismo pela via oral são processados e apresentados pelo sistema imunológico do tecido linfóide associado ao intestino (GALT). O GALT é um sistema complexo que consiste em sítios indutivos e efetores de resposta. As células induzidas por antígenos no GALT

migram para a circulação e, subsequente, colonizam a mucosa. Como resultado, o organismo é capaz de induzir resposta imune contra o antígeno no intestino e em locais distantes do qual sofreu estímulo. A produção de anticorpos IgA é uma característica das respostas imunes das mucosas e desempenha um importante papel de defesa (KIYONO; AZEGAMI, 2015). No entanto, nesse estudo não foi possível detectar SIgA específicas no intestino nos três esquemas de vacinação. Como descrito no item 4.7, a não detecção dessas imunoglobulinas não se deveu a fatores técnicos, pois foi possível a detecção de SIgA inespecíficas.

Outra abordagem da resposta imune é a análise das citocinas envolvidas nos processos. A flagelina livre é capaz de ativar TLR-5 e NOD ao mesmo tempo. A ativação de TLR é caracterizada pela produção de IL-6, e NOD pela produção de IL-1 β (CIACCI-WOLLWINE et al., 1999).

A família das citocinas IL-12 está fortemente ligada à imunidade inata e é responsável pela geração de células T_H1. A produção de IL-12 pode ser estimulada de maneira T independente, a partir da ativação dos TLR -2, 4, 5 e 9 em monócitos/macrófagos e células dendríticas (GEE et al., 2009).

Presumiu-se, inicialmente, que poderia haver alguma diferença nos níveis de citocinas produzidas após a imunização oral com os diferentes tipos de antígenos associados à sílica, o que mais uma vez não correspondeu às expectativas. As dosagens de IL-1 β , IL-6 e IL-12 foram realizadas após 8 horas de imunização, período descrito no trabalho de Akhmatova et al. (2014) onde haveria um pico de produção de citocinas. Nesse trabalho, camundongos CBA receberam pela via oral uma única dose de uma vacina contendo antígenos de quatro agentes patogênicos (*E. coli*, *P. vulgaris*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*). Após oito horas da imunização foi possível detectar níveis significantes ($p < 0,05$) de IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-5 no soro. Talvez esse período não tenha sido o ideal no nosso modelo e uma cinética de produção de citocinas poderia ser realizada para se conseguir a detecção dessas substâncias.

Mesmo não tendo sido encontradas diferenças significativas de anticorpos entre os grupos que receberam os antígenos com e sem sílica, partiu-se para a investigação celular. Foram caracterizadas as populações celulares nos linfonodos mesentéricos dos animais dos vários grupos pelo ensaio de citometria de fluxo. As células foram coletadas após três dias da imunização, momento em que os linfonodos já estão ativados (Scaramuzzi, 2013).

Os linfócitos B-1 se diferenciam dos B convencionais por sua localização anatômica, características fenotípicas e funcionais. No ensaio de citometria de fluxo foram pesquisados os subtipos B-1a e B-1b, (KANTOR; HERZENBERG, 1993). Estas células respondem prontamente a antígenos T- independentes no peritônio e nas mucosas, por isso esperávamos encontrar diferenças nos grupos em relação a esse tipo celular.

A procura por linfócitos auxiliares e citotóxicos também pareceu adequada, pois Scaramuzzi (2009) mostrou em seu trabalho que animais imunizados por via oral com antígeno de hepatite associado à SBA-15 apresentaram número total de células T CD4⁺ e CD8⁺, no linfonodo mesentérico, superior aos grupos que receberam o antígeno sozinho, sugerindo que a SBA-15 foi capaz de induzir resposta destes linfócitos.

A pesquisa das moléculas coestimulatórias pareceu importante, uma vez que a expressão de CD80 e CD86 está ligada a resposta contra antígenos T dependentes. Durante uma infecção as células que apresentam PRRs podem ser ativadas e se diferenciar em células efetoras capazes de livrar-se da infecção sem a necessidade de ativação do sistema imune adaptativo. No entanto, em certos casos, o sistema inato sozinho não consegue resolver a infecção e alerta o sistema adaptativo, sobre a natureza do antígeno, através da expressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 na superfície de APC, principalmente células dendríticas (JANEWAY; MEDZHITO, 2002).

Embora tenha se observado mais células dendríticas nos linfonodos mesentéricos dos camundongos H_{III} imunizados com o LPS encapsulado a sílica em relação aos animais imunizados com LPS sozinho, a sílica sozinha demonstrou ter capacidade de estimular DC e os outros tipos celulares caracterizados pelo ensaio de citometria de fluxo. Por esse motivo não foi possível encontrar diferenças significativas entre as populações celulares dos linfonodos mesentéricos dos grupos que receberam os antígenos com ou sem a SBA-15.

No modelo estudado neste trabalho não foi possível esclarecer o potencial adjuvante da SBA-15 e sua capacidade de carrear antígeno. Para isso utilização de antígenos que sejam menos comuns à mucosa intestinal dos animais e sensíveis a degradação no ambiente gástrico possibilitaria uma melhor avaliação da função da SBA-15 como adjuvante e veículo carreador e protetor de antígeno, respectivamente. Além disso, estudar mais a fundo a interação com antígenos de

diferentes pesos moleculares e em preparações de diferentes proporções de antígeno:sílica, poderia auxiliar para esclarecer o papel da SBA-15 na imunização oral de camundongos.

6 CONCLUSÃO

Com os sistemas de imunizações, antígenos e animais utilizados neste trabalho, não foi possível evidenciar o potencial adjuvante da sílica nanoestruturada SBA-15 na imunização oral.

REFERÊNCIAS*

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2011, 592p.
- AGUERA, J. J. **Esquitossomose mansônica em camundongos bons e maus respondedores, selecionados geneticamente quanto a resposta de anticorpos contra antígenos flagelares de *Salmonella***. 1982. 47 f. Tese (mestrado)- Escola Paulista de Medicina, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1982.
- AKHMATOVA, N. K.; EGOROVA, N. B.; KURBATOVA, E. A.; AKHMATOVA, E. A. Activation of innate immunity by bacterial ligands of Toll-like receptors. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1-7, 2014.
- ALVING C. R.; PEACHMAN, K. K; RAO, M.; REED, S. G.; Adjuvants for human vaccines. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, p. 310-315, 2012
- AZEGAMI, T.; YUKI, Y.; KIYONO, H. Challenges in mucosal vaccines for the control of infectious diseases. **International Immunology**, v. 26, p. 517–528, 2014.
- BIOZZI, G.; MOUTON, D.; SANT'ANNA, O.A.; PASSOS, H.; GENNARI, M.; REIS, M. H.; FERREIRA, V. C. A.; HEUMANN, A. M.; BOUTHILLIER, Y.; IBÁÑEZ, O. M.; STIFFEL, C.; SIQUEIRA, M.; Genetics of immune responsiveness to natural antigens in the mouse. **Current Topics Microbiology and Immunology**, v. 85, p. 31-38, 1979.
- BOYDEN, E. D. AND DIETRICH, W. F. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. **Nature Genetics**. v. 38, p. 240-244, 2006.
- BUENO, V.; PACHECO-SILVA, A. Tolerância oral: uma nova perspectiva no tratamento de doenças autoimunes. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, p. 79-85, 1999.
- CABRERA, W.; IBANEZ, O.M.; OLIVEIRA, S.L.; SANT'ANNA, O.A.; SIQUEIRA, M.; MOUTON, D.; BIOZZI, G.; Evidence for Distinct Polygenic Regulation of antibody responses to some unrelated antigens in lines of mice selected for High or Low antibody responses to somatic antigen of *Salmonella*. **Immunogenetics**, v. 16, p. 583-592, 1982.
- CARVALHO, L. V. **Estudo experimental do efeito adjuvante da sílica nanoestruturada SBA-15**. 2007. 81 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CARVALHO, L.V., RUIZ, R.C., SCARAMUZZI, K., MARENGO, E.B., MATOS, J.R., TAMBOURGI, D.V., 2010. Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15. **Vaccine**, v. 28, p. 7829–7836, 2010.

CAVALHAES, M. S.; SILVA, W. D.; BIRMAN, E. G.; SANT'ANNA, O. A.; ABRAHAMSOHN, O.; KIPNIS, T. L. Experimental paracoccidioides mycosis in high and low antibody- responder mice. I. Evolution of the disease, its correlation with the humoral immune response and the patterns of tissue lesions. **Annales del'Institut. Pasteur Immunologie**, v. 137, p. 127-141, 1986.

CIACCI-WOOLWINE, F.; MCDERMOTT, P. F.; MIZEL, F. B.; Induction of cytokine synthesis by Flagella from Gram-negative bacteria may be dependent on the activation or differentiation state of human monocytes. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 5176-5185, 1999.

COGNE M, BALLEST J.J.; SCHMITT, C.; BIZZINI, B. Total and IgE antibody levels following booster immunization with aluminum absorbed and non-absorbed tetanus toxoid in humans. **Annals of Allergy**, v. 54, p.148-151, 1985.

COX, V.C.; COULTER, A.R. Adjuvants – a classifications and review of their modes of action. **Vaccine**, v. 15, p. 248-256, 1997.

CUNNINGHAM, A. F.; FLORES-LANGARICA, A.; BOBAT, S.; MEDINA, C. C. D.; COOK, C. N. L.; ROSS, E. A.; LOPEZ-MACIAS, C.; HENDERSON, I. R. B1b cells recognize protective antigens after natural infection and vaccination. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 1-11, 2014.

DATTA, S.; REDECKE, V.; PRILLIMAN, K.; TAKABAYASHI, K.; CORR, M.; TALLANT, T.; A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. **Journal of Immunology**. v. 170, p. 4102-4110, 2003.

DE FRANCO, M.; MASSA, S.; VASSAO, R. C.; SIQUEIRA, M.; SANT'ANNA, O. A. Polygenic control of antibody production and correlation with vaccine induced resistance to rabies virus in high and low antibody responder mice. **Archives of virology**, v. 141, p. 1397-1406, 1996.

FIENGOLD, N.; FIENGOLD, J.; MOUTON, D.; BOUTHILLIER, Y.; STIFFEL, C.; BIOZZI, G.; Polygenic Regulation of antibody synthesis to sheep erythrocytes in the mouse: a Genetic analysis. **European Journal of Immunology**, v. 6, p. 43-51, 1976.

GALLIHER-BECKLEY, A.; PAPPAN, L. K.; MADERA, R.; BURAKOVA, Y.; WATERS, A.; NICKLES, M.; NIETFELD, J.; SCHLUP, J. R.; ZHONG, Q.; MCVEY, S.; DRITZ, S. S.; SHI, J. Characterization of a novel oil-in-water emulsion adjuvant for swine influenza virus and Mycoplasma hyopneumoniae vaccines. **Vaccine**, v. 33, p. 2903-2908, 2015.

GEE, K.; GUZZO, C.; MAT, N. F. C.; MA, W.; KUMAR, A. The IL-12 family of cytokines in infection, Inflammation and autoimmune disorders. **Inflammation & Allergy**, v. 8, p. 40-52, 2009.

GHASEMNEJAD, E. A.; MOHAMADNIA, Z.; DOUSTGANI, A.; HASHEMIKIA, S. Functionalized silica nanoparticles as a carrier for Betamethasone Sodium Phosphate: Drug release study and statistical optimization of drug loading by response surface method. **Materials Science and Engineering**, v. 56, p. 223-232, 2015.

GORDON, J.; KAZEMIAN, H.; ROHANI, S. MIL-53(Fe), MIL-101, and SBA-15 porous materials: Potential platforms for drug delivery. **Materials Science and Engineering**, v. 47, p. 172-179, 2015.

GOTO, N.; KATO, H.; MAEYAMA, J.; SHIBANO, M.; SAITO, T.; YAMAGUCHI, J.; YOSHIHARA, S. Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminum hydroxide with different physical properties. **Vaccine**, v. 15, p. 1364-1371, 1997.

GUPTA, R. K.; SIBER, G. R. Adjuvant human vaccines – current status, problems and future prospects. **Vaccine**, v. 13, p.1263-1276, 1995.

HOWE, S. E.; KONJUFCA, V. H. Per-Oral immunization with antigen-conjugate nanoparticles followed by subcutaneous boosting immunization induces long-lasting mucosal and systemic antibody responses in mice. **Plos One**, v. 10, 2015.

HERREMANS, T. M. P. T.; REIMERINK, J. H. J.; BUISMAN, A. M.; KIMMAN, T. G.; KOOPMANS, M. P. G. Induction of mucosal immunity by inactivated poliovirus vaccine is dependent on previous mucosal contact with live virus. **The Journal of Immunology**, v. 162, p. 5011-5018, 1999.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITO, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 197-2016, 2002.

JUNIOR, D. M.; ARAUJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; CRUVINELI, W. M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 50, p. 552-580, 2010.

KAISHO, T.; AKIRA, T. Toll-like receptor function and signaling. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, p. 979-987, 2006.

KANTOR, A. B.; HERZENBERG, L. A. Origin of murine B cell lineages. **Annual Review of Immunology**, v. 11, p. 501–538, 1993.

KIYONO, H.; AZEGAMI, T. The Mucosal Immune system: From dentistry to vaccine development. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 91, p. 423-439, 2015.

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

KUPFERSCHMIDT, N.; QAZI, K. R.; KEMI, C.; VALHOV, H.; GARCIA-BENNETTS, A. E.; GABRIELSSON, S.; SCHEYNIUS, A. Mesoporous sílica particles potentiate antigen-specific T-cell responses. **Nanomedicine**, v.9, p.1835-1846, 2014.

LAGE, S. L.; LONGO, C.; BRANCO, L. M.; COSTA, T. B.; BUZZO, C. L.; BORTOLUCI, K. R. Emerging concepts about Naip/NLRC4 inflammasomes. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1-10, 2014.

LAMCHHANE, A.; AZEGAMI, T.; KIYONO, H. The mucosal immune system for vaccine development. **Vaccine**, v. 32, p. 6711-6723, 2014.

MARTIN, F.; OLIVER, A. M.; KEARNEY, J. F. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T- independent blood-borne particulate antigens. **Immunity**, v. 14, p. 617-629, 2001.

MATOS, J. R.; MERCURI, L. P.; KRUK, M.; JARONIEC, M. Toward the synthesis of Extra-Large-Pore MCM-41 analogues. **Chemistry of Materials**, v.13, p. 1726-1731, 2001.

MCNAMEE, E. N.; MASTERSON, J. C.; VENY, M.; COLLINS, C. B.; JEDLICKA, P.; BYRNE, F. R.; NG, G. Y.; RIVERA-NIEVES, J. Chemokine receptor CCR7 regulates the intestinal TH1/ TH17/ T reg balance during Crohn's-like murine ileitis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 97, p. 1011-1022, 2014.

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

MOTA, E. F.; LIMA, M. G. S.; MELO, D. F. Adjuvantes imunológicos: Avanços e Perspectivas. **Ciência Animal**, v. 16, p. 79-88, 2006.

MOTTA, V.; SOARES, F.; SUN, T.; PHILPOTT, D. J.; Nod-Like receptors: Versatile cytosolic sentinels. **Physiology**, v. 95, p. 149-178, 2015.

PASSOS, H.C.; SIQUEIRA, M.; REIS, M.A.; FERREIRA, V.C.A.; IBÁÑEZ, O.M. O.; SANT'ANNA, O. A.; BIOZZI, G.; Genetic control of immune response to Protein Antigens. 1-two-way selective Breeding of mice for Quantitative e Antibody Responsiveness to Bovine Serum Albumin and Rabbit Gamma-Globulin. **Journal of Immunology**, v. 119, p. 1439-44, 1977.

REIS, M. H.; IBÁÑEZ, O. M.; CABRERA, W. H. K.; RIBEIRO, O. G.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; COUDERC, J. T-helper functions in mice selected for high and low antibody production (selection III): modulatory by anti-CD4+ monoclonal antibody. **Immunology**, v. 75, p. 80-85, 1992.

REIS, M. H.; PIATTI, R.; IBÁÑEZ, O. M.; CABRERA, W. H. K.; SIQUEIRA, M.; **Atividade dos linfócitos T auxiliares em linhagens de camundongos bons e maus produtores de anticorpos: Efeito do tratamento com anticorpo**

monoclonal anti L3TA. Anais. 6.**Reunião Anual das Sociedades de Biologia Experimental**,FeSBE, 1989, p. 402.

RIETSCHEL, E.T., et al., Bacterial endotoxin: Molecular relationships of structure to activity and function. **Faseb Journal**, v. 8, p. 217-225, 1994.

ROSSATO, C. **Caracterização da fase inicial da artrite induzida por pristane em camundongos selecionados para alta e baixa produção de anticorpos: envolvimento celular e molecular.** 2011, 81f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

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

SANT'ANNA, O. A.; MASSA, S.; MOUTON, D.; BOURTHILLIER, Y.; MEVEL, J. C.; IBANEZ, O. M.; VASSAO, R.; DE FRANCO, M.; BELLINATI, R.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. *Salmonella typhimurium* infection in high and low antibody responder mice: inverse correlation between antibody responsiveness and resistance to infection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 47, n. 8-9, p. 465-471, 1989.

SBROGIO- ALMEIDA, W.E.; MOSCA, T.; MASSIS, L.M.; ABRAHAMSOHN, I.A.; FERREIRA, L.C.S., Host and Bacterial Factors Affecting Induction of Immune Responses to Flagelin Expressed by Attenuated *Salmonella* Vaccine Strains. **Infection and Immunity**, V. 72, p. 2546-2555, 2004.

SCARAMUZZI, K. **Efeito adjuvante da sílica mesoporosa nanoestruturada SBA-15 na imunização pela via oral.** 2009. 74 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SCARAMUZZI, K.; OLIVEIRA, D.C.A.; CARVALHO, L.V.; TAMBOURGI, D.V.; TENÓRIO, E.C.N.; RIZZI, M.; MUSSALEM, J.; FANTINI, M.C.A.; BOTOSSO, V.F.; SANT'ANNA, O.A., Utilização da sílica nanoestruturada SBA-15 como adjuvante em imunizações com vacina para hepatite B. **Einstein**. v. 9, p. 436-41, 2011.

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

SIQUEIRA, M.; DRUMOND, L. S.; GENNARI, M.; FERREIRA, V. C. A.; SANT'ANNA, O. A.; REIS, M. H.; BIOZZI, G. Nonspecific regulation of antibody responsiveness in the mouse. **European Journal of Immunology**, v. 7, p. 1995-203, 1977.

SIQUEIRA, M.; BANDIERI, A.; REIS, M. H.; SANT'ANNA, O. A.; BIOZZI, G. Selective breeding of mice for antibody responsiveness to flagella and somatic antigens of *Salmonella*. **European Journal of Immunology**, v. 6, p. 241, 1976.

SIQUEIRA, M.; DRUMOND, L. S.; GENNARI, M.; FERREIRA, V. C. A.; REIS, M. H.; BIOZZI, G. Effect of genetic modification on resistance to *Toxoplasma gondii* infection. **Infection and Immunity**, v. 48, p. 298-302, 1985.

SELLIN, M. E.; MASLOWSKI, K. M.; MALOY, K. J.; HARD, W.D. Inflammasomes of the intestinal epithelium. **Cell**, v. 36, p. 442-450, 2015.

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

SHIMA, H.; WATANABE, T.; FUKUDA, S.; FUKUOKA, S.; OHARA, O.; OHNO, H. A novel mucosal vaccine targeting Peyer's patch M cells induces protective antigen – specific IgA responses. **International Immunology**, v. 26, p. 619-625, 2014.

STRIDELIUNS, L.; FILLER, M.; SJOHOL, I. Mucosal immunization with purified flagellin from *Salmonella* induces systemic and mucosal immune responses in C3H/HeJ mice. **Vaccine**, v. 22, p. 3797-3808, 2004.

SWEET, M. J.; HUME, D.A. Endotoxin signal transduction in macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 60, p. 8-26, 1996.

TREZENA, A. G.; SOUZA, C. M.; BORREGO, A.; MASSA, S.; SIQUEIRA, M.; DE FRANCO, M.; SANT'ANNA, O. A. Co-localization of quantitative trait loci regulating resistance to *Salmonella typhimurium* infection and specific antibody production phenotypes. **Microbe an Infection**, v. 4, p. 1409-1415, 2002.

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

WAN, M.M.; LI, Y.; YANG, T.; ZHANG, T.; SUN, X. D.; ZHU, J.H. In Situ Loading of Drugs into Mesoporous Silica SBA-15. **Chemistry - A European Journal**, v. 22, p. 6294-6301, 2016.

WANG, T.; JIANG, H.; ZHAO, Q.; WANG, S.; ZOW, M.; CHENG, G.; Enhanced mucosal and systemic immune responses obtained by porous silica nanoparticles used as an oral vaccine adjuvant: Effect of silica architecture on immunological properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, p.351-358, 2012.

WANG, M.; GAO, Z.; ZHANG, Z.; PAN, L.; ZHANG, Y. Roles of M cells in infection and mucosal vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 10, p. 3544-3551, 2014.

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