UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA BIOQUÍMICO-FARMACÊUTICA

Área de Tecnologia de Fermentações

Utilização de Peptídeo Intracelular (EL28) como Imunoestimulante
da Vacina de Raiva

MELISSA MERCEDES TORRES CHIPANA

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Stephano

São Paulo
2018

MELISSA MERCEDES TORRES CHIPANA

**Utilização de peptídeo intracelular (EL28) como imunoestimulante
da vacina de raiva**

Versão corrigida

Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Área: Tecnologia de Fermentações.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Stephano

São Paulo
2018

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

T693u Torres Chipana, Melissa Mercedes
 Utilização de peptídeo intracelular (EL28) como
 imunestimulante da vacina de raiva / Melissa
 Mercedes Torres Chipana. - São Paulo, 2018.
 78 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Stephano, Marco Antonio

1. peptídeo EL28. 2. vacina. 3. vírus rábico. 4.
imunoglobulina. 5. imunestimulante. I. T. II.
Stephano, Marco Antonio , orientador.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Melissa Mercedes Torres Chipana

Título do trabalho: Utilização de Peptídeo Intracelular (EL28) como Imunoestimulante da Vacina de Raiva.

Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Área: Tecnologia de Fermentações.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Stephano

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu pai, Antonio Pablo Torres Hoces, mãe, Mercedes Chipana Regino, e irmãos Edison Torres e Emerson Torres que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me concedeu energia e sabedoria para concluir todo esse trabalho.

Aos meus pais, Antonio e Mercedes, e irmãos, Edison e Emerson, que mesmo de longe, motivaram-me todos os anos da pós-graduação.

Ao professor Dr. Marco Antônio Stephano pela dedicação em suas orientações, paciência, e no apoio ao desenvolvimento deste projeto. Muito obrigada por repartir seu conhecimento, suas vivências, experiências, e me fazer acreditar que sou capaz de transformar meus sonhos em realidade.

Aos meus amigos, em especial, Mirla e todas as pessoas que fizeram parte dessa etapa decisiva em minha vida.

Aos meus colegas do laboratório que me ajudaram nos experimentos, nas correções do português, e suas palavras de apoio para levar em frente meu projeto.

Ao pessoal de Instituto Butantan, Celso, Marcos, Maicon, Aline e todos, que colaboram com a realização da produção de vacina de raiva e nos vários testes realizados.

Ao professor Dr. Emer Suavinho do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, por nos fornecer o peptídeo EL28 para as imunizações em camundongos.

À Flavia e equipe do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química pela ajuda no cuidado dos camundongos.

À secretaria e a todos da pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pelo apoio durante esse período.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro deste projeto.

RESUMO

CHIPANA, Melissa Mercedes Torres. **Utilização de Peptídeo Intracelular (EL28) como Imunoestimulante da Vacina de Raiva**. 2018. 78 f Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

No interesse de reduzir os efeitos adversos relacionados às vacinas veterinárias e induzir tipos específicos de resposta imune, levou-se o desenvolvimento de numerosos novos adjuvantes. Recentemente, houve o descobrimento de um peptídeo intracelular funcional obtido através do estímulo celular com INF- γ , denominado EL28, tendo como principais características a hidrossolubilidade e a biodegradabilidade e, porém, no momento carece de ensaios de imunoestimulação associados com vacinas com potencial de mercado "in vivo". Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo verificar a atividade imunoestimulante do EL28, associado ao vírus rábico inativado (VRI). Realizou-se a produção do antígeno VRI, e prepararam-se formulações vacinais: VRI associado ao EL28, VRI associado com $Al(OH)_3$ e VRI sem presença de adjuvante, para imunização de camundongos Balb/c e avaliação da resposta imune humoral. A produção de anticorpos IgG totais, IgG1 e IgG2a foram determinados pelo ensaio de ELISA indireto. E os anticorpos neutralizantes para o vírus rábico foram quantificados através do método RIFFT. Os resultados do ELISA indireto foram expressos como Dose Imunoenzimática 50% (DI50) e mostraram que não houve aumento na produção de anticorpos na resposta imune humoral (IgG totais) entre a vacina associada ao EL28 ($DI50 = 3,0 \times 10^{-3} \mu L$) e a vacina sem adjuvante ($DI50 = 2,0 \times 10^{-3} \mu L$). As IgG2a e IgG1 estão relacionados ao perfil da resposta Th1 e Th2 respectivamente, e mostraram diferença significativa em relação ao título da IgG1 entre a vacina associada ao EL28 ($DI50 = 5,9 \times 10^{-4} \mu L$) e a vacina sem adjuvante ($DI50 = 5,2 \times 10^{-4} \mu L$), enquanto para os títulos de IgG2a não houve diferença significativa entre essas vacinas. O perfil da resposta Th foi obtido através da razão entre IgG2a e IgG1, o qual demonstrou que em todas as imunizações, com e sem adjuvantes, tiveram resposta predominante do tipo Th2. O método de RIFFT mostrou um aumento na potência de anticorpos neutralizantes na vacina associada ao EL28 em relação à imunização dos animais sem nenhum adjuvante. Portanto, esses resultados demonstram aumento da especificidade na resposta imunológica da vacina associada ao EL28. Sendo assim, pelos resultados apresentados, a vacina de raiva associada ao EL28 possivelmente teria uma maior eficiência e segurança.

Palavras chaves: peptídeo EL28, vacina, vírus rábico, imunoglobulina, imunoestimulante.

ABSTRACT

CHIPANA, Melissa Mercedes Torres. **Use of Intracellular Peptide (EL28) as Immunostimulant of Rabies Vaccine**. 2018. 78 f Dissertation (Master in Science) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

In the interest of reducing the adverse effects related to veterinary vaccines and inducing specific types of immune response, numerous new adjuvants have been developed. Recently, a functional intracellular peptide obtained through cellular stimulus with the INF- γ , named EL28, it have as main characteristics the water solubility and the biodegradability, but at the moment it lacks immunostimulation assays associated with potencial market vaccine "in vivo". In this sense, the present study aimed to verify the immunostimulatory activity of EL28, associated with inactivated rabies virus (IRV). It carried out the production of IRV antigen, and prepared vaccine formulations: IRV with EL28, IRV with Al(OH) $_3$ and IRV without the presence of adjuvant, for immunization of Balb/c mice and evaluation of the humoral immune response. The production of total IgG antibodies, IgG1 and IgG2a were determined by the indirect ELISA assay. And neutralizing antibodies to rabies virus were quantified using the RIFFT method. Indirect ELISA results were expressed as 50% Immunoenzymatic Dose (ID $_{50}$) and showed no increase in antibody humoral immune response (IgG total) between the EL28 associated vaccine (ID $_{50}$ = 3.0×10^{-3} μ L) and the vaccine without adjuvant (ID $_{50}$ = 2.0×10^{-3} μ L). The IgG2a and IgG1 are related to the profile of Th1 and Th2 respectively, and showed a significant difference in relation to the IgG1 titer between the EL28 associated vaccine (ID $_{50}$ = $5,9 \times 10^{-4}$ μ L) and the non-adjuvant vaccine (ID $_{50}$ = $5,2 \times 10^{-4}$ μ L), while for IgG2a titers there was no significant difference between these vaccines. The Th response profile was obtained by the ratio of IgG2a and IgG1, which showed that in all immunizations with and without adjuvant, were predominantly Th2 response. The RIFFT method showed an increase of the potency of neutralizing antibodies in the vaccine with EL28 in relation to the immunization of the animals without any adjuvant. Therefore, these results demonstrate increased specificity in the immune response associated with EL28 vaccine. Therefore, from the results presented, the rabies vaccine associated with EL28 would possibly have a greater efficiency and safety

Keywords: adjuvants; EL28 peptides; vaccine, rabies virus, immunoglobulin, immunostimulant

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Células apresentadoras de antígeno
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i>
CIT	<i>Cell Infection Titration</i>
CTLs	Linfócito T CD8+ ou Linfócitos T citotóxicos (do inglês: <i>Citolytic T Lymphocyte</i>)
CVS	Cepa de vírus desafio padrão
DCs	Células dendritias
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DAMP	Padrão molecular associado a danos
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FAO	Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FFD50	<i>Fluorescence focus dose 50%</i>
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
INF- γ	Interferon gamma
ISCOMs	Complexo de imunoestimulação
mAb	Anticorpo monoclonal
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MHC-I	Complexo principal de histocompatibilidade de classe I
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
NAbs	Anticorpos neutralizantes
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>

PA28 α	Subunidade α do Proteassoma ativador
PA28 β	Subunidade β do Proteassoma ativador
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PRRs	Receptor de reconhecimento de padrões
RFFIT	Teste Rápido de Inibição de Foco da Fluorescência (do inglês: <i>Rapid Fluorescent Inhibiton Test</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
SNC	Sistema nervoso central
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
VRI	Vírus rábico inativado

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Desenho esquemático da sinalização do TLR. Os homodímeros TLR extracelulares (TLR4 e TLR5) são representados em preto; Heterodímeros de TLR2 e TLR1, TLR6 ou TLR10 são indicados em preto / verde. Os homodímeros intracelulares (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) são indicados em cinza
- Figura 2-** Classificação dos adjuvantes.
- Figura 3-** Estrutura do proteassoma constitutivo e imunoproteassoma.
- Figura 4-** Representação gráfica do imunoproteassoma a partir do proteassoma constitutivo exposto ao INF- γ para a obtenção de peptídeo EL28.
- Figura 5 -** Modelo hipotético das células HeLa expostas ao peptídeo EL28 com OVA: indução da atividade catalítica do proteassoma constitutivo para virar imunoproteassoma e aumento da expressão das moléculas de MHC classe I.
- Figura 6-** Modelo hipotético das células apresentadoras de antígeno expostas ao peptídeo EL28 e antígeno do vírus rábico inativado: aumento dos INF- γ e das moléculas MHC classe I e II.
- Figura 7-** Determinação da DI50 (Absorbância vs log da diluição)
- Figura 8-** Comparação das porcentagens do foco fluorescente (FF) e das diluições (Log10) entre o CVS e "Pool" das Coletas 2° e 3° dia.
- Figura 9-** Curva padrão da albumina bovina.
- Figura 10-** IgG totais, os grupos experimentais foram constituídos pelo grupo B: VRI, grupo E: VRI + EL28, grupo F: VRI + Al(OH)₃ com valores de DI50 de $2,03 \times 10^{-3}$ μ L (IC_{95%} $1,18 \times 10^{-3}$ até $3,48 \times 10^{-3}$); $3,02 \times 10^{-3}$ μ L (IC_{95%} $9,52 \times 10^{-4}$ até $9,58 \times 10^{-3}$); $3,07 \times 10^{-4}$ μ L (IC_{95%} $1,42 \times 10^{-4}$ até $6,64 \times 10^{-3}$) respectivamente.
- Figura 11-** IgG1: os grupos experimentais foram constituídos pelo grupo B: VRI, grupo E: VRI + EL28, grupo F: VRI + Al(OH)₃ com valores de DI50 de $5,2 \times 10^{-4}$ μ L (IC_{95%} $3,33 \times 10^{-4}$ até $8,12 \times 10^{-4}$); $5,9 \times 10^{-4}$ μ L (IC_{95%} $2,56 \times 10^{-4}$ até $1,35 \times 10^{-3}$); $2,2 \times 10^{-4}$ μ L (IC_{95%} $5,04 \times 10^{-7}$ até $9,24 \times 10^{-2}$) respectivamente.

- Figura 12-** Fotografia da placa de ELISA para IgG1 (branco, sem anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase; grupo A, solução salina; grupo B, antígeno; e grupo E, antígeno associado a EL28)
- Figura 13-** IgG2a: os grupos experimentais foram constituídos pelo grupo B: VRI, grupo E: VRI + EL28, grupo F: VRI + Al(OH)_3 com valores de DI50 de $9,05 \times 10^{-3} \mu\text{L}$ (IC95% $5,37 \times 10^{-3}$ até $1,53 \times 10^{-2}$); $7,25 \times 10^{-3} \mu\text{L}$ (IC95% $4,31 \times 10^{-3}$ até $1,21 \times 10^{-2}$); $2,93 \times 10^{-3} \mu\text{L}$ (IC95% $1,93 \times 10^{-3}$ até $4,45 \times 10^{-2}$) respectivamente.
- Figura 14-** Comparação do RFFIT entre a referência internacional (INT. REF) ou soro de referência e os grupos B, E e F.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 –** Campos positivos das diluições de 10^{-1} a 10^{-6} e os títulos do CVS, e coleta 2º e 3º dia; e os títulos do CVS e “Poll ”em FFD₅₀/0,05mL obtidos pelo Método de Spearman-Kärber.
- Tabela 2 –** Comparação estatística (Método de Anova com ferramenta de Bonferroni) entre a DI50 dos anticorpos anti-rábicos IgG dos grupos experimentais (grupo B, E e F) testadas por ELISA indireto
- Tabela 3 –** Comparação estatística (Método de Anova com ferramenta de Bonferroni) entre a DI50 dos anticorpos anti-rábicos IgG1 dos grupos experimentais (grupo B, E e F) testadas por ELISA indireto.
- Tabela 4 –** Comparação estatística (Método de Anova com ferramenta de Bonferroni) entre a DI50 dos anticorpos anti-rábicos IgG2a dos grupos experimentais (grupo B, E e F) testadas por ELISA indireto.
- Tabela 5 –** Isotipos de anticorpos rábicos às três semanas após a imunização de camundongos BALB/c jovens com vacinas vírus rábico inativado.

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 -** Exemplos de adjuvantes convencionais com indicação do modo de ação dominante.
- Quadro 2 -** Resumo da estrutura biologia do TLR (agonistas e localização celular).
- Quadro 3 -** Valores da razão IgG2a/IgG1 para determinar o tipo de resposta Th.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	Resposta imunológica contra vírus	2
1.1.1	Imunoestimulante	3
1.1.2	Anticorpos específicos.....	3
1.1.3	Anticorpos neutralizantes	5
1.2	Adjuvantes.....	6
1.2.1	Mecanismo de ação dos adjuvantes	7
1.2.2	Classificação dos adjuvantes	8
1.3	Peptídeos curtos como imunomoduladores	13
1.4	Peptídeos imunomoduladores como novos adjuvantes.....	14
1.5	Peptídeo EL28.....	15
1.6	Hidróxido de alumínio	19
1.7	Vacina de raiva inativada	23
1.8	Imunidade do vírus rábico.....	24
2	JUSTIFICATIVA	28
3	OBJETIVO	30
3.1	Objetivo geral	30
3.2	Objetivo específico	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	Vírus rábico.....	32
4.2	Linhagem celular e Meio de cultivo	32
4.3	Obtenção do Antígeno da Raiva.....	32
4.4	Teste de CIT (Cell Infection Titration).....	33
4.5	Dosagem de proteína por Bradford	34
4.6	Peptídeo EL28.....	34
4.7	Imunização dos camundongos	35
4.8	Coleta do sangue	36
4.9	ELISA indireto (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	36
4.10	Teste rápido de inibição do foco fluorescente (RFFIT).....	37
4.11	Potência antigênica ou soroneutralização do vírus rábico	38
4.12	Análise estatística.....	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	41
5.1	Título da infecção Celular (CIT)	41

5.2	Dosagem de proteínas (Bradford).....	42
5.3	ELISA indireto	43
5.3.1	IgG total para o vírus rábico.	43
5.3.2	Perfis dos isotipos IgG2a e IgG1.	45
5.3.3	Anticorpos IgG1.....	45
5.3.4	Anticorpos IgG2a	48
5.3.5	Análises da resposta Th1/Th2	49
5.4	RFFIT	50
6	CONCLUSÕES.....	55
7	REFERÊNCIAS.....	57

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Resposta imunológica contra vírus

A defesa antiviral consiste em uma reação mediada por citocinas na qual as células infectadas podem adquirir resistência aos vírus, ou ser destruídas pelas células especializadas do sistema imune inato, as células *natural killer* (NK), que são secretadas pela ativação celular e com os ajuda dos interferons (IFNs). IFNs tipo I podem ser produzidos por todas as células nucleadas em resposta à infecção viral. Em contraste, IFN do tipo II, bem como o IFN- γ , que é produzido exclusivamente por células T e células NK (KOYAMA S. et. al. 2008).

Os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), os *Toll-like receptors* (TLRs), são proteínas celulares que estão envolvidos para detectar componentes virais específicos, tais como RNA viral ou DNA viral ou produtos intermediários virais para induzir IFNs tipo I e outras citocinas pró-inflamatórias nas células infectadas na resposta inata (KOYAMA S. et. al. 2008).

As DCs constituem a principal conexão entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa. As DCs encontram-se nos principais alvos dos vírus para sua absorção. Consequentemente, o contato dos vírus ou de suas proteínas, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), com os PRRs das DCs estimulam, fazem a esses antígenos virais apresentassem às moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC, *major histocompatibility complex*). Os antígenos virais capturados no exterior das células, também denominados antígenos exógenos, são processados e unidos ao MHC-II e apresentados as células, linfócitos auxiliares (T *helper* ou Th), enquanto os antígenos virais produzidos dentro das células dendríticas, denominados de antígenos endógenos, são unidos ao MHC-I e apresentados aos linfócitos T citotóxicos (Tc) (BHARDWAJ; GNJATIC; SAWHNEY, 2010).

De acordo com os mecanismos efetores, a imunidade adaptativa pode ser dividida em celular e humoral. A resposta celular é mediada pelos linfócitos Th e linfócitos Tc. A resposta humoral é mediada pelos anticorpos (IgM, IgG)

produzidos pelos plasmócitos, que são células derivadas dos linfócitos B (KLIMPEL, 1996)

.Em geral, a segregação dos isotipos das imunoglobulinas IgG2a e IgG1 são considerados marcadores para a resposta Th1 e Th2 respectivamente. As células Th1 produzem IL-2, IFN- γ e linfotóxina, enquanto as células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-13. Além disso, as células Th1 e Th2 ajudam a ativação de CTLs (linfócitos T citotóxicos) e células B, respectivamente, enquanto todas as células Th podem promover a produção de subtipos de anticorpos (NICHOLLS; MADERA; HANCOCK, 2010).

Para uma resposta imune de qualidade, são necessários diferentes tipos de respostas imunes para eliminar efetivamente diferentes tipos de infecções. Uma resposta humoral (Th2) é eficaz na propagação de uma resposta imune para neutralizar as toxinas bacterianas e ajudar a combater as infecções extracelulares. Por outro lado, as infecções intracelulares exigem uma resposta imune mediada por células (Th1) para sua eliminação, embora infecções virais tendam a exigir uma resposta imune mais equilibrada. A ação das citocinas Th1, principalmente pela IL-12 e INF- γ , opõem-se as citocinas Th2, pelas IL-4 e IL-10, que resulta uma polarização para uma resposta imune mediada por células ou por resposta imune humoral, respectivamente. Assim, as vacinas devem estimular e ativar células adequadas, e obter o equilíbrio em ambas as respostas Th1/Th2 (NICHOLLS; MADERA; HANCOCK, 2010)

1.1.1 Imunoestimulante

Substância que adicionada em uma vacina cria um desequilíbrio na resposta imune inata ou adaptativa para estimular o sistema imunológico induzindo um aumento ou diminuição na função de qualquer um dos seus componentes e gerar uma resposta imunológica contra um tipo de microrganismo.

1.1.2 Anticorpos específicos

O conceito de especificidade dos anticorpos foi inicialmente considerado como uma propriedade que permite que as diferentes classes de anticorpos sejam

distinguidas das outras. Atualmente, a especificidade do reconhecimento de antígeno-anticorpo foi interpretada como um ajuste mais ou menos entre moléculas que possuíam diferentes graus de complementaridade estereoquímica. As superfícies de proteínas têm muitos epítomos diferentes, e cada uma delas é capaz de reconhecer os seus próprios anticorpos complementários. Por exemplo, quando dois antígenos são comparados com um painel de anticorpos monoclonais (Mabs) criados contra eles, esses antígenos parecerão idênticos se for usado um Mab que reconheça um epítomo idêntico presente em ambos os antígenos. Então, pode-se explicar a especificidade do anticorpo em termos de potencial de discriminação dele com o fim de distinguir entre dois antígenos para determinar se um anticorpo é considerado específico ou não (VAN REGENMORTEL, 2014).

A especificidade do anticorpo é uma propriedade ternária que tem significado apenas em relação a um mínimo de três parceiros, por exemplo, um paratopo e dois epítomos. A especificidade é apenas significativa em relação à capacidade de um anticorpo para reagir de forma diferente com dois ou mais antígenos e assim discriminar entre eles (VAN REGENMORTEL, 2014).

Os epítomos e paratopos são entidades relacionadas definidas por sua complementaridade mútua, e elas dependem umas das outras para adquirir uma identidade reconhecível. Os epítomos e os paratopos não são, portanto, características estruturais intrínsecas de um antígeno e molécula de anticorpo, respectivamente, porque não podem existir na ausência de uma ligação relacionada entre os dois complementos. Isso significa que o número de epítomos de uma proteína é igual a um número de anticorpos diferentes que podem ser criados contra ele. Esta dependência relacionada significa que, assim que um epítomo seja alterado ligeiramente e a ligação para o paratopo seja afetada, o paratopo não estará em proporcionalmente no número para o mesmo epítomo (VAN REGENMORTEL, 2014).

A heteroespecificidade dos anticorpos reage mais fortemente com outro antígeno do que o utilizado no processo de imunização que provocou o anticorpo. Heterospecificidade ocorre porque as células B podem ser selecionadas e desencadeadas por imunógenos dotados apenas de afinidade mínima por seus receptores de células B (BCRs). Então, o anticorpo de afinidade baixa ou moderada pode ser obtido para que reaja melhor com

epítomos heterólogos dotados de um grau superior de ajuste com o paratopo (VAN REGENMORTEL, 2014).

A poliespecificidade de anticorpos refere-se à capacidade de uma molécula de anticorpo de se ligar a uma grande variedade de diversos epítomos em diferentes antígenos. O sitio de ligação de anticorpo é capaz de acomodar um número significativo de subsítios de paratopo menores de 10-20 resíduos de aminoácidos, inclusive alguns dos quais podem estar sobrepostos. As seis regiões determinantes da complementaridade (CDR) de um anticorpo nunca constituem um único específico paratopo (parte de um anticorpo que se liga ao epítomo) para um epítomo grande, mas compreendem vários paratopo menores capazes de se ligar a epítomos individuais em diferentes antígenos. A superfície do local de ligação ao anticorpo é de 280nm^2 de área, enquanto que a superfície de cada paratopo é de $30\text{-}110\text{nm}^2$, dependendo se ele se liga a um pequeno hapteno ou a uma molécula de proteína. Portanto, os anticorpos são específicos para um único epítomo ou antígeno, embora, evidentemente, possam parecer monoespecíficos se forem testados apenas quanto à sua capacidade para se ligar ao antígeno imunizante (VAN REGENMORTEL, 2014).

1.1.3 Anticorpos neutralizantes

Os anticorpos neutralizantes (NAbs) são a melhor relação de proteção contra infecção viral após a vacinação. Do mesmo modo, eles são marcadores de imunidade contra a reinfeção após uma infecção aguda ter sido eliminada (KLASSE, 2014).

Essa imunidade viral pode durar até seis meses (vírus rábico) ou de longa vida como no vírus da varíola (as respostas de anticorpos antivirais permaneceram estáveis entre 1-75 anos após a vacinação, enquanto as respostas das células T antivirais diminuíram lentamente, com uma meia-vida de 8-15 anos) (HAMMARLUND et al., 2014). Várias vacinas contra infecções virais são boas indutoras de respostas protetoras neutralizantes de anticorpos, mas ainda existem problemas sérios no campo da vacinação viral. Um problema é a variabilidade antigênica. Por exemplo, os alvos antigênicos para anticorpos neutralizantes no vírus da gripe variam em abundância e, portanto, uma nova vacina deve ser preparada a cada nova estação. O vírus da hepatite

C e o vírus da imunodeficiência humana são ainda mais variáveis e, após anos de pesquisa, ainda não se podem induzir respostas imunes virais que se protegem contra esses próprios vírus (BRACIALE; YOUNG, 2013). Os mecanismos de neutralização têm muitas particularidades a considerar, por exemplo: como os NAbs se ligam ao vírus, se induzem mudança conformacional do epítipo viral, se inativam irreversivelmente as proteínas virais que medeiam a entrada de ligação para sua neutralização e se eles são mais eficazes contra o vírus, antes ou após da infecção das células. Com todos esses aspectos determinaram a característica de um mAb (KLASSE, 2014).

Os NAbs contra a raiva no campo são muito importantes para uma resposta precoce e efetiva à raiva nos setores de saúde humana e animal.

1.2 Adjuvantes

Adjuvante é uma substância que adicionada em uma vacina tem a função de potencializar a resposta imune humoral e celular.

Adjuvantes de vacinas são: produtos químicos, componentes microbianos ou proteínas de mamífero. Os adjuvantes em desenvolvimento ou em vacinas experimentais e comerciais são, por exemplo, sais de alumínio, emulsões de óleos, saponinas, complexos imunoestimulantes (ISCOM), lipossomas, micropartículas, copolímeros de blocos não iônicos, polissacarídeos derivados, citocinas, e uma ampla variedade de derivados de bactérias.

O papel de adjuvante na formulação de vacina foi originalmente descrito como “substâncias utilizadas em combinação com um antígeno específico, produz uma resposta imunitária mais robusta do que o antígeno sozinho”.

Um parâmetro chave que conduz a segurança da vacina e perfil de eficácia é a seleção correta de um adjuvante.

Um adjuvante ideal tem: (a) estimular uma resposta celular T/humoral forte, (b) regular a imunidade de longo prazo, (c) não ser tóxico e (d) não induzir resposta autoimune ou reações alérgicas (REED; MARK; FOX, 2013).

Fatores que influenciam na escolha de um adjuvante incluem: espécies animais, patógeno específico, o antígeno vacinal, via de imunização e tipo de imunidade necessário (AGUILAR; RODRÍGUEZ, 2007).

Recentemente, a adição de sistemas adjuvantes mais potentes foi promovida para estimular uma resposta imune de sistemas imunologicamente enfraquecidos e para aumentar a imunogenicidade de antígenos fracos ou para reduzir a quantidade de antígeno necessário nas formulações vacinais em geral.

A maioria dos adjuvantes licenciados foi descoberta por um tipo de abordagem de teste e erro, um método de descoberta altamente ineficiente, sendo poucos adjuvantes testados em triagem clínica e a maioria deles nunca foi aceito para a vacinação, devido à toxicidade e aos efeitos adversos.

Os sais de alumínio (hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio) são os uns dos adjuvantes aprovados pela FDA que tem uso amplo nas vacinas humanas e veterinárias. Não entanto, estão sujeitos a estudos de possível aparição de reações adversas.

1.2.1 Mecanismo de ação dos adjuvantes

Os adjuvantes podem funcionar de várias maneiras, atuando como veículo de entrega específico ou molécula de direcionamento para atuar como um depósito no local da injeção para representar um sinal de perigo específico que induz uma resposta imune de tipo específica (AWATE et al., 2013 e LAMBRECHT et al., 2009). Na maioria dos casos, os adjuvantes causam algum tipo de lesão tecidual, que posteriormente leva ao recrutamento de células imunes e ao reconhecimento pelo sistema imunológico e no envolvimento de mecanismos altamente sofisticados, resultando em estimulação e ativação da imunidade inata e adaptativa (CALABRO et al., 2011).

Os mecanismos de ação destes compostos podem variar na indução da resposta imune inata, bem como na formação das respostas mediadas por células e anticorpos. Embora o mecanismo molecular detalhado de ação de muitos adjuvantes seja ainda evasivo, a descoberta dos TLRs forneceu novas informações críticas sobre o efeito imunoestimulador de numerosos componentes bacterianos que envolvem TLRs (TOUSSI; MASSARI, 2014).

A importância do mecanismo de ação que é associada com os TLRs das células apresentadoras de antígeno (APCs) e a sua ligação com os padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) ou seus similares

imunoestimulantes induzem à produção de uma série de mediadores importantes para a resposta imune inata, cujas citocinas e quimiocinas produzem um aumento consequente da regulação de moléculas coestimulatórias essenciais e migração à rede linfática para indução da resposta imune adaptativa com amadurecimento (AGUILAR; RODRÍGUEZ, 2007; REED et, al., 2009).

Compreender o mecanismo de estimulação dos TLRs e o aprimoramento da resposta imune à jusante tem sido essencial no desenvolvimento de uma nova geração de receptores de PRRs direcionados aos adjuvantes.

1.2.2 Classificação dos adjuvantes

Existem muitos candidatos de adjuvantes de orientação aos PRRs, tais como os TLRs, atualmente são investigados para uso adjuvante (Quadro 1).

Quadro 1 - Exemplos de adjuvantes convencionais com indicação do modo de ação dominante. **D**: Sistema de *delivery* (agregados, partículas), **I**: imunoestimulador, **M**: membrana ativa (tipo detergente), **Mix**: ação mista, **TDM**: trehalose 6,6'-dimicolato, **MPL**: monofosforil lípido A, **CWS**: esqueleto de parede celular de micobactérias, **tMDP**: dipéptido de treonil muramila, **a <10 µm**: as partículas são absorvidas de forma eficiente pelas APCs; **> 20 µm**: as partículas asseguram a liberação de antígenos a longo prazo. **b**: usados em conjunto com outras substâncias, por exemplo, micropartículas.

Tipo	Nome comum	Substância	Modo de ação	Tipo de imunidade
Emulsão água em óleo	Freund's completo	Óleo mineral, surfactante, micobactérias mortas.	D, I, Mix	Th1
	Freund's incompleto	Óleo mineral, surfactante	D	Th1
	Montanide®	Óleo mineral, surfactante, imunomodulador	D, I	
	Titermax®	Esqualeno (óleo metabólico), emulsionante, copolímero em bloco, sílica microparticulada.	D, I	
Emulsão óleo em água	Ribi®	Esqualeno (óleo metabólico), surfactante Tween 80, imunoestimulação: TDM, MPL, CWS.	I	
	SAF®	Esqualeno (óleo metabólico), Tween 80, copolímeros de bloco, tMDP	I	

Tipo	Nome comum	Substância	Modo de ação	Tipo de imunidade
	MF59	Esqualeno (metab. Óleo), Tween 80, Span 85	I	
Partículas	Alum, Alhydrogel	Hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio.	D, I	Th2
	ISCOMs	Partículas de colesterol, fosfolípido, saponina Quil A, detergente e antígeno 40 nm	D, I	Th1
	Micropartículas de PLG	Poly [lactide-coglycolide] poliéster, biodegradável Escala de micrômetros ^a	D	
	Micropartículas de Alginato	Polissacarídeo biodegradável Escala de micrômetros ^a	D	
	Liposomes	Vesículas de fosfolípidos Escala de micrômetros ^a	D	
Compostos ativos ^b	Saponinas (Quil A, QS21)	Saponina triterpenóide anfipática e hemolítica	M	Th1
	Monofosforil lípido A, (MPL)	Núcleo (core) de lipopolissacarídeo quimicamente modificado	M, I	
	DDA	Cloreto de dioctadecilamônio anfífilo	M	

Fonte: HEEGAARD et al., 2011

Os TLRs fornecem uma ponte entre Imunidade inata e adaptativa (Quadro 2). Uma nova classe de adjuvante de vacina pode ser baseada na via da indução dos TLRs, dessa maneira nasce uma classificação atual dos adjuvantes (Figura 2): nomeados: TLRs-dependentes e TLRs- independentes. Os adjuvantes TLRs-dependentes estão presentes na membrana plasmática de células imunes (TLR 1, 2, 4, 5, 6) e também em receptores de vesículas intracelulares bem como: endossomas e lisossomos (TLR 3, 7, 8, 9 e 10). TLR 1 se liga a moléculas expressadas por micróbios a fungos. TLR 2 a peptideoglicanos, TLR 3 a dsRNA (RNA fita dupla), TLR 4 a lipopolissacarídeos e ácidos lipoteicóico, TLR5 a flagelo bacteriano, TLR 6 a diacil-lipopeptídeos, TLR 7 a ssRNA (RNA fita simples, regiões ricas em uracila), TLR 8 a ssRNA (RNA fita simples, regiões ricas em guanina), TLR9 a CpG DNA (Figura 1) (DE GREGORIO; D'ORO; WACK, 2009).

Figura 1 - Desenho esquemático da sinalização do TLR. Os homodímeros TLR extracelulares (TLR4 e TLR5) são representados em preto; os heterodímeros de TLR2 e TLR1, TLR6 ou TLR10 são indicados em preto / verde. Os homodímeros intracelulares (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) são indicados em cinza.

Fonte: TOUSSI E MASSARI (2014)

Os adjuvantes TLRs-independente são os adjuvantes que se ligam a receptores citosólicos que incluem: gene-I induzível por ácido retinóico (RIG-I) - like receptores (RLRs), nucleótido de ligação de domínio de oligomerização (NOD) -like receptores (NLRs) e Sensores de DNA citosólico. RLRs pertencem à família helicases de RNA que detecta especificamente espécies de RNA derivados de vírus no citoplasma e coordenar programas antivirais através da indução IFN do Tipo I (BACCALA et al., 2007; MAISONNEUVE et al., 2014). A descoberta dos TLRs transmembranares e sistemas de detecção, tais como citosólicas RLRs, NLRs, e os sensores de DNA revelou que o sistema imune inato possui vários mecanismos de reconhecimento em diferentes compartimentos celulares (BACCALA et al., 2007; MAISONNEUVE et al., 2014).

Além disso, cada antígeno tem uma imunogenicidade intrínseca diferente e interage de forma diferente com imunoestimulantes e portadores, e não existem algoritmos confiáveis para permitir a seleção de adjuvantes ótimos com base em propriedades físico-químicas ou imunológicas de um antígeno.

Quadro 2 - Resumo da estrutura biologia do TLR (agonistas e localização celular)

<i>Toll-like receptor</i>	Estrutura reconhecida	Localização do TLR
1	Lipoproteínas bacterianas	Superfície celular
2	Componentes da parede celular bacteriana	Superfície celular
3	RNA de cadeia dupla	Endosoma
4	Componentes da parede celular bacteriana	Superfície celular
5	Flagelina bacteriana	Superfície celular
6	Lipoproteínas bacterianas	Superfície celular
7	RNA de cadeia simples	Endosoma
8	RNA de cadeia simples	Endosoma
9	ADN de CpG bacteriano	Endosoma

Fonte: HEEGAARD et al., 2011

Figura 2 - Classificação dos adjuvantes.

1.3 Peptídeos curtos como imunomoduladores

Existem pesquisas incertas baseadas no desenvolvimento de novos adjuvantes que inclui a avaliação e otimização de peptídeos imunomoduladores curtos. Os peptídeos curtos foram registrados por seus efeitos imunomoduladores e foram investigados como um meio de controle de infecção. Por exemplo, alguns peptídeos curtos de defesa do hospedeiro, como defensinas, podem ser antimicrobianos, e interromper a membrana celular ou direcionar as bactérias internamente. Alternativamente, alguns peptídeos curtos do hospedeiro, como o LL-37, são capazes de modular a resposta imune inata por recrutamento e/ou ativação de células imunes, o que pode levar a uma maior eliminação bacteriana (BOWDISH et al., 2005; HANCOCK et al., 2006).

As sequências peptídicas que não são encontradas ou são extremamente incomuns na natureza mostraram potencializar diferentes respostas imunes mediadas por vacinas em relação aos peptídeos comumente encontrados na natureza (PATEL et al., 2012).

Este desenvolvimento de novos peptídeos seguiu a hipótese inicial de que as sequências de aminoácidos curtas e raras ou inexistentes poderiam atuar como moduladores imunológicos contribuindo positivamente para ativação imune e vacinas adjuvantes específicas para o antígeno.

Essa hipótese decorre do paradigma de que a amplitude e a amplitude de uma resposta imune podem estar relacionadas à frequência com que uma sequência de aminoácidos específica é encontrada na natureza. Os peptídeos raros referem-se à frequência de aparência natural de uma pequena sequência de aminoácidos na natureza (LUCCHESE et al., 2007).

As correlações entre a forte ativação das células B e T na presença de peptídeos pequenos curtos de auto-similaridade levam ao seu uso como potenciais adjuvantes (LUCCHESE et al., 2007; KANDUC et al., 2009).

Esses peptídeos raros, em conjunto, são capazes de provocar uma forte resposta imune, mas individualmente, são capazes de induzir ou suprimir a resposta imunológica.

Peptídeos raros podem abordar todas essas características imunológicas. As vantagens de usar peptídeos curtos como um adjuvante poderiam ser: indução da resposta imune humoral e celular ao antígeno da vacina sem efeitos colaterais visíveis, ação sinérgica com adjuvantes alternativos, produção custo-eficiência, facilidade no transporte e armazenamento, facilidade na administração, baixa reatividade cruzada, sem necessidade de novas técnicas para administração. Não entanto, também tem desvantagens porque não tem mecanismo de ação parcial elucidado, precisa de modelo animal preliminar e perfil de toxicidade para dar continuidade ao estudo (DONG; KOBINGER, 2013).

Peptídeos curtos raros têm imenso potencial no campo dos novos adjuvantes. A inclusão nas vacinas atualmente licenciadas deve ser considerada para o desenvolvimento clínico rápido de estratégias de vacinação melhoradas. Embora, os peptídeos raros e curtos tenham sido inicialmente usando o conceito de frequência peptídica para atividade adjuvante, o mesmo conceito também pode ser aplicado a outros campos de pesquisa. A evidência de peptídeos com atividade de imunossupressão foi descrita (PATEL et al., 2012) e este efeito deve ser considerado em áreas como alergia, transplante e autoimunidade. Em geral, uma consideração importante é que o campo da vacina global poderia beneficiar substancialmente do aumento de uma comunidade científica dedicada à pesquisa orientada para adjuvantes hipotéticos. Uma forte lógica científica precisa ser a força motriz por trás do desenvolvimento dos adjuvantes. O sistema imunológico é uma rede complexa e acessória; Portanto, os adjuvantes precisam ser aperfeiçoados e específicos para alcançar a eficácia e a segurança ideais para vacinas. O avanço nesta área poderia levar ao desenvolvimento de vacinas com eficácia superior a um custo menor, ou, alternativamente, contribuir para o melhor direcionamento de manifestações clínicas autoimunes (DONG; KOBINGER, 2013).

1.4 Peptídeos imunomoduladores como novos adjuvantes

Em geral, os peptídeos curtos raros foram eficazes para estimular uma resposta imune adequada em doses subótimas de vacinas de subunidades

(como Engerix-B) e de DNA, em camundongos ou furões sem quaisquer efeitos colaterais visíveis, bem como a capacidade de atuar sinérgicamente com outros adjuvantes (PATEL et al., 2012). Estes peptídeos podem ser rapidamente sintetizados em massa de uma forma que é relativamente barata devido ao seu curto comprimento. Isso reduz o custo por vacina e permite que mais doses de vacina estejam disponíveis para uso devido à poupança de dose, o que é especialmente crucial durante uma situação de epidemia ou pandemia. Na produção em grande escala, o custo poderia ser tão baixo quanto 8 cêntimos por dose humana, tornando seu uso acessível para grandes campanhas de vacinação em qualquer continente. A liofilização de peptídeos permite um transporte e armazenamento estáveis em temperaturas não ideais sem perda de potência. A administração da vacina permanece a mesma que sem adjuvante peptídico; não há instrumentos adicionais para comprar ou técnicas difíceis de adquirir antes da administração. Uma desvantagem atual de adjuvantes peptídicos raros é a falta de conhecimento em relação à eficácia com várias plataformas de vacinas, a sustentabilidade da potenciação imune, o perfil de toxicidade e segurança, a eficácia em espécies animais maiores (p. Ex., Humanos), entre outros, em geral relacionadas a investigação incompleta e desenvolvimento. Os detalhes dos mecanismos de ação de como esses peptídeos são capazes de melhorar as respostas imunes ainda não é esclarecido totalmente. No entanto, estudos de depleção celular identificaram células assassinas naturais como um estimulador importante na ativação do sistema imune (PATEL et al., 2012). Esse é um caminho inovador e interessante a seguir em respeito à potenciação imune mediada pelo adjuvante, pois também poderia levar ao desenvolvimento de outros adjuvantes, incluindo alguns com base em moléculas menores e mais baratas. No mínimo, a compreensão dos mecanismos de ação pode aprimorar o uso de peptídeos curtos raros com função adjuvante.

1.5 Peptídeo EL28

O peptídeo EL28 (VGSELIQKY) corresponde à sequência de aminoácidos 251-259 da subunidade reguladora 4 da 19S ATPase humana

(PSMC1) da célula HeLa (Figura 3). O peptídeo EL28 caracteriza-se por sua hidrossolubilidade e biodegradabilidade (MONTE et al., 2016).

A obtenção do peptídeo EL28 foi realizado pelo Montes e colaboradores, aonde as células HeLa foram estimuladas com $\text{INF-}\gamma$ e os imunoproteossomas formaram cadeias diferentes de aminoácidos, entre elas, o peptídeo EL28, como ilustrado na Figura 4 (KIMURA et al., 2015; MONTE et al., 2016).

Os proteassomas constitutivos (proteassoma 26S) encontram-se no núcleo e citoplasma da maioria de células, onde degradam proteínas ubiquitinadas e formam cadeias de aminoácidos. O proteassoma 26S é formado por dois anéis β internos (cada anel com sete subunidades β ; β_1 , β_2 , β_3 , β_4 , β_5 , β_6 e β_7), dois anéis α externos (cada anel com sete subunidades; α_1 , α_2 , α_3 , α_4 , α_5 , α_6 e α_7) e dois Caps (proteassoma 19S, complexo regulatório). Na imunoestimulação (por exemplo: células HeLa expostas com $\text{INF-}\gamma$), as subunidades β_1 , β_2 , β_5 e os dois Caps do proteossoma 26S induzem a expressão das subunidades β_{i1} , β_{i2} , β_{i5} , $\text{PA28}\alpha$ e $\text{PA28}\beta$ substituindo-as, respectivamente. Quando essas subunidades são expressas, forma-se o proteassoma isoformo alternativo nomeado imunoproteassoma. A expressão do imunoproteassomas é induzida por interferão- γ ($\text{IFN-}\gamma$) e fator de necrose tumoral- α ($\text{TNF-}\alpha$) em células imunes (por exemplo: APCs) ou em células não imunes, sob essas condições (KIMURA et al., 2015).

Figura 3 - Estrutura do proteassoma constitutivo e imunoproteassoma.

Fonte: Kimura e colaboradores (2015)

Figura 4 - Representação gráfica do imunoproteassoma a partir do proteassoma constitutivo exposto ao INF- γ para a obtenção de peptídeo EL28.

Fonte: MONTE et. al. (2016)

Em seguida Monte e colaboradores, em outro experimento *in vitro*, as células HeLa mimetizadas foram reestimuladas a 100 μ M de peptídeo EL28 acoplado a *cell penetrating peptide* (cpp), EL28-cpp, cuja sequência cpp foi YGRKKRRQRRR; e reexpostas a 200 U IFN- γ por 48 h. Observou-se aumento na expressão da subunidade imunitária $\beta 5i$ das células HeLa, portanto, existe a possibilidade que EL28 induz a atividade catalítica do proteassoma constitutivo para virar imunoproteassoma (MONTE et al., 2016).

Em outro estudo Monte e colaboradores, imunizaram camundongos com ovalbúmina (OVA; modelo de antígeno vacinal) associada ao EL28-cpp, a qual aumentou a proliferação de células T CD8 + específicos para OVA, enquanto a proliferação de células T CD4 + específicos para OVA não houve aumento. Assim, também viram que EL28-cpp melhora e modula positivamente a resposta imunológica secundária de IgG anti-BSA (*bovine serum albumin*) com elevadas concentrações de anticorpos (MONTE et al., 2016).

A infecção viral é vinculada com aumento de IFNs (RASMUSSEN et al., 2007). Os IFNs induzidos por vírus estimula a geração de imunoproteassomas no local da infecção (SHIN et al., 2006). O aumento da expressão de imunoproteassoma é associado ao aumento na expressão das moléculas de

MHC classe I e II. (KIMURA et al., 2015). É bem estabelecido que o INF- γ aumenta a produção de peptídeos para apresentação em moléculas de MHC de classe I. (MARTINI et al., 2016).

Na suposição que umas células infectadas recebessem uma vacina pós-infecção associada ao EL28, esta vacina possivelmente poderia desencadear uma resposta imunológica com aumento da expressão do antígeno vacinal (peptídeos) nas moléculas de MHC classe I e II nas APCs (exemplo: macrófagos, células dendríticas, etc). Também, espera-se que haja um aumento na proliferação de células T CD8 e produção de anticorpos IgG específicos.

Figura 5 – Modelo hipotético das células HeLa expostas ao peptídeo EL28 com OVA: indução da atividade catalítica do proteassoma constitutivo para virar imunoproteassoma e aumento da expressão das moléculas de MHC classe I.

Fonte: Adaptado de Kimura e colaboradores (2015)

No projeto, durante o estudo em camundongos, espera-se que haja um aumento na atividade dos imunoproteassomas e que as APCs possam aumentar a expressão das moléculas MHC classe I e MHC classe II como ilustrado na Figura 6. Neste caso ao analisar uma APCs tipo célula dendrítica

verifica-se que ela possui moléculas MHC classe I e II, portanto as duas classes poderiam ser expressas.

Figura 6 – Modelo hipotético das células apresentadoras de antígeno expostas ao peptídeo EL28 e antígeno do vírus rábico inativado: aumento dos INF- γ e das moléculas MHC classe I e II.

Fonte: Elaborado pelo autor

1.6 Hidróxido de alumínio

Glenny e colaboradores foram os primeiros a demonstrarem o efeito adjuvante de compostos de alumínio em 1926, com o toxóide da difteria adsorvido em alumínio. Glenny preparou uma variedade de precipitados toxóide diftérico e investigou a sua imunogenicidade. Entre estas estavam toxóides precipitados pela adição de alúmen de potássio ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$). Glenny observou que injetando o toxóide da difteria como um precipitado de alúmen conduziu a um aumento significativo na resposta imune contra o toxóide. As vacinas preparadas de acordo com este princípio têm sido utilizadas na prática e são referidas como vacinas precipitadas com alúmen. Uma investigação mostrou que essas preparações podem ser altamente heterogêneas, dependendo do tipo de ânion (bicarbonato, sulfato ou fosfato) que esteja presente na precipitação. No entanto, os géis pré-formados

hidratados de hidróxido de alumínio têm a capacidade de adsorver os antígenos proteicos, em uma solução aquosa. Estes géis são bem definidos e padronizados, sendo nomeados de vacinas adsorvidas em alumínio. A palavra "Alum" também é usada para descrever ao gel de hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio, mas o uso correto da terminologia seria alúmen de potássio, $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ (LINDBLAD, 2004).

Os adjuvantes de alumínio poderiam ser considerados como formadores de depósito (efeito de depósito) (AWATE S, et. al, 2013). Com este adjuvante cria-se a formação de um foco inflamatório atraindo células imunocompetentes pouco depois da injeção feita (PETROVSKY; AGUILAR, 2004).

Os mecanismos físico-químicos durante a adsorção do antígeno são complexos e dependem da natureza do mesmo. Como norma geral, para muitos antígenos de proteína de adsorção (por exemplo, as proteínas do vírus rábico) é melhor que esteja entre seu intervalo de pH ótimo e o seu ponto isoelétrico, e ajustado ao ponto de carga zero do adjuvante de alumínio. Isto se aplica tanto para adjuvantes de hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio. Neste intervalo, o adjuvante e o antígeno terão cargas elétricas opostas, facilitando a atração eletrostática e adsorção (LINDBLAD, 2004).

Nas últimas duas décadas, o interesse em sais de alumínio reacendeu e desde 2007 há uma tendência de compreender a ação adjuvante destes compostos. Os sais de alumínio têm como desvantagem o depósito dos mesmos nos tecidos, mas tem como vantagem aumentar a resposta imunológica na captação do antígeno e estabilidade do mesmo no local de inoculação. Ademais, sais de alumínio promovem fagocitose do antígeno por APCs, tais como células dendríticas (DCs), macrófagos e células B. Além disso, ativa os macrófagos e aumenta a expressão das moléculas do MHC de classe II e estimula a produção de células apresentadoras do antígeno, pode também promover a produção de IL-4, IL-5 e IL-10 e estimular a persistência de células Th2. Outra grande vantagem dos sais de alumínio é que ele tem sido utilizado há mais de 70 anos e possui vários estudos de segurança e eficácia (MARRACK et al., 2009).

Em 2008, foi sugerido que a citotoxicidade dos sais de alumínio conduz à liberação de ácido úrico *in vivo*, o qual atua como um padrão molecular associado a danos (DAMP), necessário para a atividade adjuvante. Além disso,

foi capaz de mostrar a ativação de caspase-1 *in vivo*, que é mediada pela família NLR, domínio *pyrin* 3 (NLRP3; também conhecido como inflamassoma NALP3) e proteína de apoptose associada a *speck-like* que contém um domínio de recrutamento de caspase (CARD); também conhecido como PYCARD ou inflamassoma NLRP3 (MARRACK et al., 2009). O estudo de Franchi e Núñez (2008) indicou que o hidróxido de alumínio desencadeia a ativação do inflamassoma NALP3, conduzindo à secreção de IL-1 β em macrófagos. Essa proposta é consistente com os relatórios que demonstram que o hidróxido de alumínio induz a secreção de IL-1 β a partir de células dendríticas.

Umas das limitações na aplicação de adjuvantes de alumínio seria a resposta ideal das citocinas Th2. Uma resposta imunitária Th2 não protege contra doenças para as quais a imunidade Th1 ou dos CTLs mediados por células que são essenciais para a proteção (por exemplo, parasitas intracelulares obrigatórias, tuberculose, malária, leishmaniose, lepra e da SIDA) (LINDBLAD, 2004). Outras limitações específicas de adjuvantes de alumínio são o aumento da produção de IgE, na alergenicidade (OFFIT; JEW, 2003). Embora o alumínio tenha boas propriedades para a entrega de antígenos, ele não é adequado para as proteínas de baixo peso molecular, porque as vacinas adsorvidas em alumínio desencadeiam uma resposta imunitária de curto prazo, exigindo um reforço daquelas para atingir a resposta imune minimamente ideal (SIVAKUMAR et al., 2011).

Na medicina veterinária, adjuvantes de alumínio têm sido utilizados em um grande número de formulações de vacinas contra as doenças virais e bacterianas na tentativa de produzir vacinas antiparasitárias. Dentre os exemplos de aplicação de adjuvantes de alumínio em vacinas veterinárias para vírus temos: vacina de vírus da bronquite Infecciosa Aviária, vacina de vírus da hepatite canina, vacina da doença Newcastle e vacina da raiva (LINDBLAD, 2004).

Muitas das vacinas veterinárias inativadas contém o adjuvante hidróxido de alumínio, que são administradas em animais de companhia tais como cães e gatos. Essas vacinas são frequentemente inoculadas por via subcutânea e o desenvolvimento de câncer poderia estar relacionado devido a presença do alumínio como corpo estranho no organismo do animal (WOODWARD, 2011).

Existem estudos em que o acúmulo de alumínio leva a uma inflamação aguda, passa para uma fase crônica e pode se tornar um câncer. A inflamação crônica envolve monócitos, macrófagos, linfócitos, células de plasma e fibroblastos e também é mediada por uma série de substâncias, incluindo o sistema do complemento, citocinas, fatores de crescimento, e as espécies reativas de oxigênio. Ocorre a destruição de tecido, fibrose, levando a uma doença. Também pode ocorrer a formação de granulomas e a agregação dos macrófagos acompanhada por linfócitos. Essa inflamação crônica é associada com o câncer. Nos últimos anos, esta associação tem-se fortalecido.

Em cães e gatos, há uma variedade de sarcomas de tecidos moles que podem surgir espontaneamente incluindo fibrossarcoma, mixossarcoma, lipossarcoma, neurofibrossarcoma-Schwannoma maligno, rabdomiossarcoma e leiomiossarcoma (WOODWARD, 2011).

No entanto, existem ocorrências de fibrose extensiva no interior do tecido subcutâneo. Também foram encontradas evidências de alumínio residual acumulado no citoplasma de macrófagos infiltrantes no músculo adjacente de gatos vacinados com o adjuvante alumínio-Quil, 62 dias após a injeção (DAY et al., 2007).

No outro estudo compararam-se dois adjuvantes: Montanide GEL PETA e outro a base de alumínio. Foi determinado que 120 dias após a primeira imunização com a primeira vacina não houve fibrose, enquanto a outra desenvolveu fibrose, tecidos necróticos e granuloma. Também se observou reações de pequenos edemas e inchaço no local inoculado (menos de 2 cm) e a duração das reações no local de inoculação era dependente do adjuvante (DEVILLE et al., 2011). Em um estudo realizado em 2003 para determinar os efeitos do adjuvante de alumínio, seis cães foram vacinados contra a raiva, dos quais quatro desenvolveram fibrossarcomas nos locais de injeção (VASCELLARI et al., 2003).

Outro estudo foi realizado em gatos vacinados anualmente contra a infecção por calicivírus, rinotraqueíte viral felina, panleucopenia e raiva. Desenvolveram tumores entre 5 e 8 meses após a vacinação como fibrossarcomas associado pós-vacinação. Os tumores foram excisados e caracterizados como circunscritos, subcutâneos, firmes e brancos com necrose central. Também foi encontrado um número variável de linfócitos, células

plasmáticas e eosinófilos que estavam presentes na borda da necrose. A inflamação periférica continha linfócitos, macrófagos e histiócitos (macrófagos inativos) (DEIM; PALMAI; CSERNI et al., 2008).

1.7 Vacina de raiva inativada

A raiva é uma encefalite viral aguda, progressiva e fatal causada pelo vírus rábico que afeta ao homem, animais domésticos e animais silvestres. A transmissão para seres humanos se dá pelo contato direto das secreções de animais infectados por este vírus, principalmente através mordidas ou lambeduras, como também por arranhões. É considerada uma zoonose (doença dos animais transmitida aos seres humanos) (MINISTERIO DA SAÚDE, 2017; JACKSON, 2010).

O vírus rábico pertence à família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus*. Possui RNA (ácido desoxirribonucleico) de cadeia simples negativa e não segmentado. Esse RNA é fortemente ligado à nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), a proteína larga (L); o envoltório é formado por uma dupla membrana fosfolipídica proveniente da célula hospedeira. Esse envoltório é associado a duas proteínas: a glicoproteína (G) e a proteína da matriz (M) (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002; SOKOL; STANCEK; KOPROWSKI, 1971). A glicoproteína G (80.000 Dalton) é uma proteína estrutural, e única capaz de desencadear a produção de anticorpos neutralizantes que confere imunidade no hospedeiro. (PULMANAUSAHAKUL et al., 2008).

O instituto Butantan é produtor da vacina de raiva inativada para animais. A vacina é constituída pelo antígeno rábico inteiro inativado pela β -propiolactona e como adjuvante, o hidróxido de alumínio.

Existem vários métodos para a inativação do vírus rábico, como o tratamento com β -propiolactona, acetiletienoimina ou outras “iminas”, ou irradiação ultravioleta. Fenol e formaldeído não são recomendados, pois podem reduzir a imunogenicidade viral e apresentar toxicidade ou resíduos irritantes. A BPL é a substância mais utilizada, quase sempre na concentração de 1:4000 e em meios com o pH ajustado para valores superiores a 7,0. A β -propiolactona também inativa bactérias e outros possíveis vírus contaminantes, mas sem afetar a antigenicidade do vírus rábico (MESLIN et al., 1996).

Alguns métodos combinam a ação do calor e a β -propiolactona para assegurar a completa inativação viral e a total hidrólise do agente inativante. Após a inativação, dependendo do conteúdo antigênico, a suspensão viral pode ser concentrada por ultrafiltração em membranas semipermeáveis (com massa molecular relativa seletiva para 100.000). Um parâmetro preciso para se determinar a antigenicidade de uma suspensão viral é a quantificação, por ELISA ou imunodifusão radial, da glicoproteína presente na suspensão viral (MESLIN; KAPLAN; KOPROWSKY, 1996).

A suspensão viral pode ser liofilizada e congelada ou armazenada em forma líquida. No último caso, é recomendada a utilização de estabilizantes e a adição de adjuvantes antes da distribuição do produto em ampolas (MESLIN; KAPLAN; KOPROWSKY, 1996).

A proteína estimada por dose é de 2-4 mg por vacina para que não produza efeitos inflamatórios.

A vacina antirrábica para uso veterinário obedece à portaria ministerial nº 228 (BRASIL, 1988). Essa portaria determina a especificidade mínima da vacina, como a sua pureza, inocuidade e determinação de potência. O método utilizado para determinação da potência da vacina, no instituto Butantan, é o método *in vitro* ABT (*Antibody-Binding Test*), sendo que a portaria ministerial determina o teste de Hanbel. Este último método está em desuso devido à necessidade de usar um grande número de animais e não determinar a potência com precisão. A norma para produção e controle da vacina antirrábica não determina o modo como deva ser produzida, apenas os critérios de controle de qualidade, com exceção da potência que usa métodos internacionais como NIH (National Institute of Health).

1.8 Imunidade do vírus rábico

Ao contrário de muitos vírus que causam infecção aguda, o vírus rábico ultrapassa as defesas imunes do hospedeiro, por um longo período, devido ao seu extremo neurotropismo, neuroinvasividade e neurovirulência.

Neuroinvasividade, neurotropismo e neurovirulência são as principais características que definem o vírus rábico. A velocidade de absorção do vírus,

a capacidade de se espalhar de forma eficiente de célula a célula e a taxa de replicação são os principais fatores que determinam a patogenicidade deste vírus (DIETZSCHOLD et al., 2008).

Os vírus rábicos patogênicos parecem fugir do reconhecimento imunológico através de sua capacidade de manter o nível mínimo de seus RNAs e antígenos expressos, em particular a glicoproteína G. Em contraste, as cepas de vírus da raiva atenuados replicam-se muito rápido, expressam grandes quantidades de proteína G e induzem fortes respostas imunes inatas e adaptativas que impedem a propagação do vírus para o interior do SNC e finalmente eliminam a infecção (DIETZSCHOLD et al., 2008).

Ao ingressar nos neurônios, o movimento para o cérebro através da medula espinhal é rápido e associado a um aumento explosivo na replicação do vírus. O vírus rábico torna-se protegido da ação dos anticorpos, das células do sistema imune e da ação dos interferons, responsáveis pela resposta imune inespecífica. O vírus rábico é capaz de induzir a produção de interferons antes de sua migração para o sistema nervoso central (SNC) (JOHNSON et al., 2007).

As APCs (macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans, etc.), quando entram em contato com o vírus rábico, fagocitam e processam esses vírus para apresentá-lo às células imunes. Essa apresentação é essencial para a ativação dos linfócitos T auxiliares, que vão produzir diferentes citocinas. Estas ativam diferentes células implicadas na eliminação direta do vírus ou de células infectadas e auxiliam a produção de anticorpos pelos linfócitos B (JOHNSON et al., 2007)

A estimulação dos linfócitos B para a produção de anticorpos, na infecção, só se dá após o aparecimento dos sintomas clínicos. Portanto, a possibilidade de neutralização da infecção viral só se produzirá, após a invasão do SNC e, neste momento, a doença imediatamente adquirirá uma forma irreversível. O título de anticorpos neutralizantes permanece baixo até a fase terminal da doença e atinge seu pico próximo à morte da vítima (JOHNSON et al., 2007).

O principal correlato de proteção, como demonstrado pela eficácia da pós-vacinação para o desafio do vírus e numerosos estudos experimentais, é a presença de anticorpos neutralizantes (JOHNSON ; CUNNINGHAM ; FOOKS, 2010).

O papel principal dos anticorpos neutralizantes é bloquear o vírus extracelular antes que encontre o receptor das junções neuromusculares, limitando sua propagação no nível do local de infecção e sua progressão para o SNC (JOHNSON et al., 2007)

. Uma resposta mais rápida à infecção, particularmente antes de o vírus entrar no cérebro e a capacidade desse anticorpo neutralizante para entrar no SNC seria esperado para aumentar a sobrevivência ou limitar a propagação do vírus (JOHNSON ; CUNNINGHAM ; FOOKS, 2010).

A resposta imune celular é, talvez, o mecanismo mais importante da resposta imune ao vírus rábico. Os linfócitos T participam da proteção de diferentes maneiras: (1) estimulando, por intermédio dos linfócitos T auxiliares, as células B para que produzam anticorpos; (2) como efetoras de imunidade, na forma de células T citotóxicas, lisando as células infectadas; (3) induzindo a síntese de substâncias mediadoras da estimulação de diferentes células; e (4) como células de memória imunológica (JOHNSON et al., 2007)

.

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Este projeto tem como meta associar o estudo de novos adjuvantes com a necessidade de reduzir os efeitos adversos associados a vacinas e seus adjuvantes para manutenção da segurança e eficácia segundo a FAO.

Recentes estudos do peptídeo EL28, hidrossolúvel e biodegradável, ambas características que facilitará sua administração e evitará a acumulação ao longo do tempo, por tanto, garantir sua segurança.

Os estudos de novas rotas de ação de adjuvantes poderiam aprimorar o conhecimento nesta área, como o caso do EL28, que provavelmente aumente a expressão das moléculas MHC classe I e II nas APCs, e ao mesmo tempo a produção de anticorpos específicos, e assim, garantir sua eficácia.

Existe um único estudo em camundongos imunizados com OVA, modelo de antígeno vacinal, associada ao EL28; no qual mostraram aumento na resposta imune secundária com anticorpos específicos para OVA.

No setor veterinário, a vacina de raiva para felino contém como adjuvante escualeno, marcol, e na sua maioria, o hidróxido de alumínio. No entanto, remete-se incidências epidemiológicas de reações adversas registradas, sobre acúmulos de hidróxido de alumínio na zona de injeção associado a fibrossarcomas em felinos, e apesar disto, este adjuvante continua sendo usado nessas formulações vacinais.

Este projeto tem como finalidade estudar novos adjuvantes, o peptídeo EL28 associado a um antígeno real, foi escolhido com a necessidade de estudar suas propriedades imunológicas.

OBJETIVO

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

- O objetivo deste trabalho é verificar a atividade adjuvante ou imunoestimuladora do EL28 na produção de anticorpos específicos em vacina contra raiva animal.

3.2 Objetivo específico

- Comparar a antigenicidade do vírus rábico inativado associado ao EL28 e também ao hidróxido de alumínio (ELISA).
- Determinar a potência neutralizante dos anticorpos gerados nas imunizações de camundongos com a vacina da raiva inativada associada ao EL28, ao hidróxido de alumínio e sem nenhum adjuvante (RFFIT).

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Vírus rábico

O vírus rábico da cepa fixa Pasteur. É proveniente do Instituto Pasteur de Paris. O vírus pertence ao Lote 01/14, 5ª passagem e potência 4,6 UI/mL. O vírus rábico cepa CVS11 (cepa origem: ATCC - VR959) foi utilizado para o método de RFFIT frente ao soro dos animais imunizados. Ambos vírus foram mantidos no banco de trabalho a -80°C no Laboratório Especial Piloto de Pesquisa e Desenvolvimento de Imunobiológicos Veterinários (LEPDIV) do Instituto Butantan. Foram liberados para uso após ser submetido a testes de Controle de Qualidade (Pesquisa de Agentes Adventícios, Identidade Viral, Pesquisa de Micoplasma e Esterilidade Fúngica e Bacteriana) e apresentado resultados satisfatórios em todos eles.

4.2 Linhagem celular e Meio de cultivo

As células BHK-21 C13 (*baby hamster kidney*) (ATCC: CLL10) foram cultivadas em frascos T25cm² até 300cm² aderidas. Para quantificação e aferição da viabilidade de células/mL, utilizou-se o método de exclusão por solução de *Trypan blue*. O meio utilizado para o cultivo foi o meio mínimo essencial de Eagle (E-MEM), suplementado com 10% (no crescimento celular) e 2% (na infecção viral) de soro fetal bovino (SFB) para preparação da vacina.

4.3 Obtenção do Antígeno da Raiva

As células foram cultivadas a partir do descongelamento de um criotubo do banco de células trabalho. Foram realizadas passagens sucessivas para atingir o escalonamento celular em frascos T com área de 25 cm², 75 cm², 175 cm² e 300 cm². Durante as passagens, as células foram desprendidas da superfície dos frascos por meio de lavagem com solução de tripsina e versene. Em seguida, realizou-se a contagem das células no frasco T 300 cm² com ajuda da câmara de Neubauer obtendo aproximadamente um número de células: 18x10⁶ células por garrafa.

O vírus rábico foi descongelado e inoculado nas células BHK-21, o inóculo viral teve o título de $10^{4,5}$ FFD₅₀ (*fluorescence focus dose* 50% - dose de foco fluorescente 50%), e o MOI (*multiplicity of infection*) foi 0,1, sendo o MOI a razão entre a quantidade de partículas virais infectantes (em mL) para o número de células a ser infectadas (em mL). O cálculo do volume de inóculo viral foi realizado segundo a equação 1:

$$Vol. de inóculo viral = \frac{MOI \times n^{\circ} \text{ totais de células}}{\text{Antilog.do tit.do inóculo em FFD}_{50} \div 0,05} \quad (1)$$

O resultado foi 2,8mL de volume de inóculo viral por garrafa. As garrafas foram incubadas na estufa a 34°C por 2 horas para a adsorção viral, sendo posteriormente completadas para o volume final de 200 mL com meio E-MEM 2% de SFB. O sobrenadante contendo os vírus cultivados nos frascos foi coletado após 48 horas e 72 horas, depois armazenado (freezer, -80°C) em frascos de polipropileno. Logo, os vírus foram descongelados e clarificados através do sistema de ultrafiltração tangencial Pellicon 2 com uma membrana de porosidade absoluta (0,45 µm) para eliminar os detritos celulares, depois foi armazenado (freezer, -80°C) em frascos de polipropileno. Em seguida, a suspensão viral foi descongelada e inativada por meio da adição de uma solução diluída 1:10 de β-propiolactona, aonde a concentração final na suspensão viral purificada foi 1:4000 (β-propiolactona: suspensão de vírus de raiva). A suspensão ficou incubada em câmara fria (5 ± 3 °C) por 24 horas e logo após em estufa a 37 °C por 2 horas, ambas as operações foram sob agitação. Para o volume final de 5000 mL da suspensão de vírus de raiva, usou-se 1,25 mL de β-propiolactona. A purificação da vacina do vírus rábico inativada (VRI) foi realizada com dietilaminoetil (DEAE) celulose, esse processo foi por adsorção (pH 7,2) e sob agitação lenta na câmara fria (5 ± 3°C) durante 15 minutos. A separação da suspensão viral purificada foi por filtração clarificante (filtro 0,45 µm).

4.4 Teste de CIT (Cell Infection Titration)

Amostras dos antígenos de vírus rábico vivo (antes da inativação viral) foram diluídas de 10⁻¹ até 10⁻⁶ de forma seriada em meio E-MEM com 2.5% SFB e foram colocadas 50 µL dessas diluições na microplacas de poliestireno

de 96 poços. Foram adicionados 3,7 a 104 células BHK-21 e deixadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 22 horas. Controle negativo foram as células BHK-21 C13 e controle positivo o CVS (referência). Depois foi descartado o meio E-MEM e a placa foi lavada com tampão fosfato – salino (PBS). As células foram fixadas com acetona 80% a -20°C. Foram marcadas as células com imunoglobulina anti-nucleocapsídeo rábica conjugada com fluoresceína a 37°C durante 1 hora. Após, foram adicionados 70 µL de glicerina tamponada pH 8,5 a cada poço e as placas foram observadas em microscópio de fluorescência as placas foram observadas em microscópio de fluorescência (10 campos em cada orifício da microplaca). Foram considerados positivos os campos que continham um ou mais focos fluorescentes e anotados os números de campos positivos por número de campos observados para cada diluição da amostra. Os resultados foram expressos em Dose Foco Fluorescência 50% / 0,05mL (FFD50/0,05mL). A Dose Foco Fluorescência 50% no teste de CIT, interpreta-se como o título de vírus que infecta o 50 % das células presentes por cada poço. Este teste é utilizado como controle de processo na produção do antígeno de vírus rábico (WEBSTER; CASEY, 1996)

4.5 Dosagem de proteína por Bradford

O método de Bradford é baseado na formação de um complexo entre o corante, Brilliant Blue G e proteínas em solução. A concentração das proteínas totais de vacina anti-rábica foi medida utilizando o Bradford Assay Kit. Resumidamente, preparou-se a diluição da solução padrão proteica de soro de albumina bovina (*Thermo scientific*), concentrações seriadas de 2000, 1000, 500, 200, 100, 50, 25 µg/mL, e as amostras de antígeno de vírus de raiva inativo (VRI) por triplicata na placa de 96 poços. Em seguida, acrescentou-se o reagente de Bradford (*Sigma Life Science*) em cada poço, a placa foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos. A absorbância foi medida a 595nm (CARLSSON N. et al., 2011).

4.6 Peptídeo EL28

O peptídeo EL28 foi sintetizado com um peptídeo de penetração celular (cpp; YGRKKRRQRRR) ligado covalentemente ao seu terminal C ou N; a pureza foi superior a 95% (MONTE et al., 2016).

O peptídeo EL28 foi fornecido pelo Dr. Emer Suavinho do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. A síntese do EL28 foi realizada por Proteimax Biotechnology LTDA, São Paulo, SP, Brazil.

4.7 Imunização dos camundongos

Foram utilizados camundongos Balb/c machos com 7 semanas de idade adquiridos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Tais camundongos têm perfil genético conhecido, apresentando uniformidade fenotípica e são *specific-pathogen-free* (SPF). Todos os experimentos envolvendo camundongos foram conduzidos com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF 21.2016-P516). Os camundongos foram mantidos em instalações de barreiras aprovadas pelo Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química USP e foram deixados aclimatar durante uma semana nas instalações do biotério antes do início da imunização. O ambiente foi de 12 horas luz e 12 horas noite.

Grupos de camundongos foram imunizados, no dia 1 e 14 com uma única dose (0,5 mL por camundongo) de vírus rábico inativado com potência igual 1UI/mL, na presença ou ausência de adjuvantes, sendo o grupo-controle imunizado apenas com solução salina. A administração das formulações foi pela via intraperitoneal.

Para avaliação da resposta imune induzida pelo adjuvante EL28 foram formados 6 (seis) grupos, com 6 (seis) camundongos em cada grupo (duas gaiolas com 3 animais por grupo) com um total de 36 camundongos e foram administradas as seguintes formulações. No grupo A: n = 6, solução salina (0,09 %) como controle negativo; grupo B: n = 6, antígeno (VRI, 1UI/mL) como controle positivo; grupo C: n = 6, EL28 (8µL de peptídeo EL28 10mM por formulação); grupo D: n = 6, Al(OH)₃ (400 µL de Al⁺³ 10,24 mg/mL por formulação); grupo E: n = 6, antígeno (VRI, 1UI/mL) + EL28 (8µL de peptídeo EL28 10mM por formulação); grupo F: n = 6; Antígeno (VRI, 1UI/mL) + Al(OH)₃ (400 µL de Al⁺³ 10,24 mg/mL por formulação). Os grupos A, C e D foram os controles negativos, o grupo E foi o controle positivo, os grupos B e F foram os estudados. Em seguida, foram obtidas amostras do sangue dentro dos

princípios éticos da experimentação animal, nos dias 7, 14 e 28 após a primeira imunização, para titulação de anticorpos das classes IgG, e subclasses IgG1 e IgG2a contra o vírus rábico por ensaio de ELISA indireto.

4.8 Coleta do sangue

Os grupos experimentais foram colocados em gaiolas com maravalha e o sangue foi coletado pela veia maxilar. Os camundongos foram anestesiados com cloridrato de quetamina (100mg/Kg) e cloridrato de xilasina (10mg/Kg) na dose de 0,1mL/10g. O sangue foi coletado em um *ependorf* e centrifugado a 1200 rpm durante 30 minutos para a obtenção do soro. Os sobrenadantes foram removidos, distribuídos em *ependorf* e armazenados a -22 °C para posterior análise de produção de anticorpos por ELISA indireto.

4.9 ELISA indireto (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Os títulos individuais de anticorpos contra o vírus rábico, em camundongos, foram determinados pela técnica de reação imunoenzimática ELISA indireta (ENGVAL, 1980). Microplacas de 96 poços (COSTAR®) foram sensibilizadas com o antígeno de vírus rábico inativado na concentração 30µg/mL diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9,6. Colocou-se em cada poço 100µl para em seguida incubar *overnight* à 4°C. Os sítios livres de cada poço foram bloqueados por 2 horas à temperatura ambiente com 100µl de solução de gelatina (Synth) a 5% em PBS 0,1M pH 7,4. Após, adicionou-se 2µL dos soros de camundongo em 198 µL de solução de gelatina (Synth) a 0,5% em PBS 0,1M pH 7,4 no primeiro poço para diluir em série (razão 2) e incubar à temperatura de ambiente por 2 horas. Foi utilizado o anticorpo anti-IgG de camundongo desenvolvido em cabra e conjugado à peroxidase (Sigma Chemical CO.®). O anticorpo anti-IgG1(cadeia específica pesada) de camundongo desenvolvido em cabra não conjugada (Sigma Chemical CO.®) e anticorpo anti-IgG (H+L) de cabra desenvolvido em coelho conjugado com peroxidase, O anticorpo anti-IgG2a (cadeia específica pesada) de camundongo desenvolvido em cabra não conjugada (Sigma Chemical CO.®) e anticorpo anti-IgG (H+L) de cabra desenvolvido em coelho conjugado com peroxidase. Como substrato, utilizam-se *O-phenylenediamine* (Sigma Chemical CO.®) e peróxido de hidrogênio 30 volumes, por 30 minutos e ao abrigo da luz. A

reação foi interrompida após 15 minutos, pela adição de ácido sulfúrico a 3M. Foi utilizado um leitor de ELISA (Power Wave XS2 da Biotek) com filtro de 492nm para a medição. Os títulos foram obtidos através do processamento das densidades ópticas obtidas versus o logaritmo da diluição (VOLLER; BARLTLETT; BIDWELL, 1978; SERVAT et al., 2007; OKDA et al., 2015). Os resultados dos IgG totais, IgG1 e IgG2a foram expressos em Dose Imunoenzimática 50% (DI50). Uma DI50 é a concentração de anticorpos (IgG ou IgG1 ou IgG2a) que se liga aos 50% de antígenos vírus rábico inativado aderido ao poço da placa.

O software Prism (GraphPad 5) apresenta o gráfico da DI50. Esse gráfico é representado por uma curva sigmoide (Figura 7) que segue a equação 2:

$$Y = \frac{BOTTOM + (TOP - BOTTOM)}{(1 + 10^{(LogDI50 - X)})} \quad (2)$$

Figura 7 – Determinação da DI50 (Absorbância x log da diluição)

4.10 Teste rápido de inibição do foco fluorescente (RFFIT)

O Teste de Inibição de Foco Fluorescente Rápido (RFFIT) é um dos testes altamente sensíveis, específicos e mais utilizados para determinar o anticorpo neutralizante do vírus rábico. O RFFIT é uma técnica *in vitro*

recomendada pela WHO (WHO, 2011), utilizando-se a variante "*Challenge Virus Standard*" do vírus rábico (CVS-11) e células BHK21 - C13 ("*Baby Hamster Kidney*"). A base da técnica utilizada encontra-se descrita por SMITH, YAGER E BAER (1996) e modificada por MOURA et al (2008). Usou-se como controles negativos, CVS-11 e as células BHK21-C13; e como controle positivo, o soro de referência. As amostras do soro de camundongo e soro de referência (potência 1 UI/mL) foram diluídas em série, na razão 2, usando meio MEM com 2,5% de soro fetal bovino na microplaca. Acrescentou-se uma quantidade fixa de vírus rábico cepa CVS (10^2 FFD₅₀) e incubou-se a microplaca com as misturas de soro e vírus em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C durante 90 minutos. Em seguida, foram adicionados a cada poço aproximadamente $3,7 \times 10^4$ células BHK21 em meio MEM com 2,5% de soro fetal bovino. Incubou-se novamente a microplaca a 37 °C com 5% de CO₂ durante 22 horas. As placas foram lavadas com PBS pH 8,0 e foram fixadas com acetona a 80% resfriada a -20 °C por 15 minutos. Adicionou-se a imunoglobulina anti-nucleocapsídeo rábica conjugada com isotiocianato de fluoresceína e incubou-se a 37 °C durante 30 minutos. As placas foram lavadas e cada poço foi lido no microscópio de fluorescência invertido com aumento de 200X (Eclipse). Para cada poço foram lidos 10 campos, sendo considerados positivos quando não apresentaram focos fluorescentes, e negativos quando apresentaram um ou mais focos fluorescentes. Após a leitura completa da placa foi realizado o cálculo do título de anticorpos neutralizantes ou a dose formadora de focos fluorescentes em 50% dos campos (DFF₅₀) pelo método de Spearman-Kärber (DEAN; ABELSETH, 1973; FEYSSAGUET et al., 2007; KRÄMER et al., 2007; KOSTENSE et al., 2012). Dose Foco Fluorescência 50% no teste de RFFIT, interpreta-se como o título a diluição dos anticorpos rábicos capazes de neutralizar 50% do vírus rábico cepa CVS11 e produzir proporcionalmente focos fluorescentes em 50% dos campos observados.

4.11 Potência antigênica ou soroneutralização do vírus rábico

Depois de calculado a DFF₅₀ das amostras do soro de camundongo e do soro de referência (1 UI/mL) pelo método de Spearman-Kärber, calculou-se a potência das amostras de soro de camundongo gerado pelas formulações de vacinas descritas anteriormente. (RAMAKRISHNAN, 2016).

A resposta da DFF₅₀ da amostra deve estar entre a maior e a menor diluição utilizada no ensaio. Essas diluições formaram uma curva sigmoide que deve apresentar uma relação dose/resposta. A potência é determinada segundo a equação 3:

$$\text{Potência em } \frac{\text{UI}}{\text{mL}} = \frac{\text{DFF}_{50}\text{amostra} \times \left[\text{Conc. } \frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right] \text{SR}}{\text{DFF}_{50}\text{SR}} \quad (3)$$

Onde:

SR: soro de referência.

DFF₅₀: Dose Foco Fluorescência 50%

4.12 Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo teste de Anova com ferramenta de Bonferroni utilizando o software Prism (GraphPad 5). Os resultados foram expressos como: média geométrica, e erro padrão (EP) e considerados estatisticamente significativos se $P < 0,05$.

RESULTADO E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Título da infecção Celular (CIT)

Os antígenos de vírus rábico produzidos nas células BHK-21 C13 (ATCC: CLL10), foram titulados pelo método CIT. Os resultados foram expressos em FFD₅₀/0,05mL. Foram comparados os títulos das amostras do CVS (referência) e o “pool” da coleta do 2º e 3º dia após a infecção celular pelo vírus, para determinar a sua infectividade celular cujo valor foi 10^{-2,84} FFD₅₀/0,05mL, (Tabela 1), esse valor é o esperado segundo a referência do Laboratório Especial Piloto de Pesquisa e Desenvolvimento de Imunobiológicos Veterinários (LEPDIV) do Instituto Butantan. A curva sigmoide aparece na Figura 8.

Tabela 1- Campos fluorescentes/campos totais, das diluições de 10⁻¹ a 10⁻⁶ e os títulos do CVS, e coleta 2º e 3º dia; e os títulos do CVS e “Pool ”em FFD₅₀/0,05mL obtidos pelo Método de Spearman-Kärber.

Diluições	CVS	“Pool” da Coleta 2º e 3º dia
10 ⁻¹	10/10	10/10
10 ⁻²	10/10	10/10
10 ⁻³	7/10	4/10
10 ⁻⁴	1/10	1/10
10 ⁻⁵	0/10	0/10
10 ⁻⁶	0/10	0/10
Títulos (FFD₅₀/0,05mL)	10 ^{-3,3}	10 ^{-2,84}

Figura 8 - Comparação das inciências relativas do foco fluorescente (FF) e das diluições (Log10) entre o CVS e “Pool” das Coletas 2º e 3º dia.

5.2 Dosagem de proteínas (Bradford)

As concentrações de proteínas contidas na vacina de raiva inativa foram determinadas pelo Método de Bradford. A equação da curva padrão com albumina de soro bovina foi $Y=0,000293 \cdot X - 0,0195$; ($R^2=0,997$ como aparece na Figura 9. O resultado do teor de proteína foi 374 $\mu\text{g/mL}$ do antígeno concentrado (inativado). Esse valor foi o desejado porque se manteve em menores concentrações (2000-4000 μg por dose) que produzem reações inflamatórias. Também serviu como referência para diluir o antígeno concentrado até 30 $\mu\text{g/mL}$ (concentração por poço das placas de ELISA).

Figura 9 - Curva padrão da albumina bovina.

5.3 ELISA indireto

As amostras de soro de camundongos imunizados obtidas após o 28º dia da primeira imunização foram analisadas pelo teste de ELISA indireto, como descrito no material e métodos. No soro foram analisados a presença de IgG, IgG1 e IgG2a específica para o vírus rábico; cujos resultados (em triplicata) estão representados pela média geométrica dos valores de absorbância em (452 nm), na forma de Dose Imunoenzimática 50% (DI50) para cada grupo experimental. Os resultados apresentaram CV < 20%. Os grupos experimentais foram constituídos pelo grupo B: VRI, grupo E: VRI + EL28, grupo F: VRI + Al(OH)₃. Os grupos controle (grupo A, só solução salina; grupo C, só EL28; e grupo D, só Al(OH)₃) não apresentaram curva dose X resposta, sendo a absorbância em 492nm próximo ao controle do branco em todas as diluições.

5.3.1 IgG total para o vírus rábico.

Amostras de soro de camundongos foram analisadas para determinação da presença de anticorpos da classe IgG, cujos valores de DI50 para os grupos B, E e F foram $2,03 \times 10^{-3} \mu\text{L}$ (IC95% $1,18 \times 10^{-3}$ até $3,48 \times 10^{-3}$); $3,02 \times 10^{-3} \mu\text{L}$ (IC95% $9,52 \times 10^{-4}$ até $9,58 \times 10^{-3}$); $3,07 \times 10^{-4} \mu\text{L}$ (IC95% $1,42 \times 10^{-4}$ até $6,64 \times 10^{-3}$) respectivamente (Figura 10). Não houve diferencia significativa entre os valores da DI50 dos grupos B e E. No entanto, o DI50 do grupo F foi menor em comparação com os grupos B e E. Os títulos de DI50 para IgG1 no grupo B, E e F calculados foram 1/494; 1/331; 1/3254 respectivamente (Figura 10).

Figura 10 – IgG totais, os grupos experimentais foram constituídos pelo grupo B: VRI, grupo E: VRI + EL28, grupo F: VRI + $\text{Al}(\text{OH})_3$ com valores de DI50 de $2,03 \times 10^{-3} \mu\text{L}$ (IC95% $1,18 \times 10^{-3}$ até $3,48 \times 10^{-3}$); $3,02 \times 10^{-3} \mu\text{L}$ (IC95% $9,52 \times 10^{-4}$ até $9,58 \times 10^{-3}$); $3,07 \times 10^{-4} \mu\text{L}$ (IC95% $1,42 \times 10^{-4}$ até $6,64 \times 10^{-3}$) respectivamente.

As comparações dos grupos que apresentaram DI50 de IgG específicas para o vírus rábico foram comparados pelo método de ANOVA aplicando se a ferramenta de Bonferroni. Pela ANOVA os resultados apresentaram diferença significativa, e ao aplicar a ferramenta de Bonferroni verificamos entre quais os grupos houve aquela diferença significativa. Portanto, houve somente diferença significativa entre o grupo que recebeu antígeno rábico com $\text{Al}(\text{OH})_3$ (grupo F) em comparação aos grupos que receberam somente antígeno (grupo B) e o antígeno associado a EL28 (grupo E), enquanto que não houve diferença significativa entre os grupos B e grupo E (Tabela 2).

Sendo assim, pela definição clássica de adjuvante podemos afirmar que pelo teste de ELISA para IgG total o peptídeo EL28 não apresentou efeito

adjuvante. Um adjuvante tem como função aumentar a resposta imunológica humoral (IgG) em comparação com uma vacina sem adjuvante.

Tabela 2 – Comparação estatística (Método de Anova com ferramenta de Bonferroni) entre a DI50 dos anticorpos anti-rábicos IgG dos grupos experimentais (grupo B, E e F) testadas por ELISA indireto.

IgG Total			
	GRUPO B	GRUPO E	GRUPO F
Grupo B	ND	Não	P < 0,001
Grupo E	Não	ND	P < 0,001
Grupo F	P < 0,001	P < 0,001	ND

ND: não determinado

Nesta análises dos IgG totais só conseguimos examinar o efeito adjuvante, porém estudamos as proporções dos isotipos de anticorpos IgG1 a IgG2a geradas em resposta à imunização da vacina de raiva com e sem adjuvante para fornecer uma medida relativa da contribuição das respostas imunitárias humorais de tipo Th2 e Th1 respectivamente.

5.3.2 Perfis dos isotipos IgG2a e IgG1.

Em geral, a segregação dos isotipos das imunoglobulinas IgG2a e IgG1 são considerados marcadores para a resposta Th1 e Th2, respectivamente.

Desse modo, para análise do perfil da resposta imunológica Th1/Th2, amostras de soro dos camundongos imunizados obtidas após o 28º dia da primeira imunização foram analisadas quanto a presença de IgG1 e IgG2a antivírus rábico pelo teste e ELISA indireto, como descrito anteriormente. Os títulos de IgG1 e IgG2a foram representados como a média geométrica de valores de absorbância (452 nm) na forma de Dose Imunoenzimática 50% (DI50) para cada grupo experimental.

5.3.3 Anticorpos IgG1

Amostras de soro de camundongos foram analisadas para determinação da presença de anticorpos da subclasse IgG1, cujos valores de DI50 para os grupos B, E e F foram $5,2 \times 10^{-4} \mu\text{L}$ ($\text{IC}_{95\%}$ $3,33 \times 10^{-4}$ até $8,12 \times 10^{-4}$); $5,9 \times 10^{-4} \mu\text{L}$

($IC_{95\%}$ $2,56 \times 10^{-4}$ até $1,35 \times 10^{-3}$); $2,2 \times 10^{-4} \mu L$ ($IC_{95\%}$ $5,04 \times 10^{-7}$ até $9,24 \times 10^{-2}$) respectivamente (Figura 11). Não houve diferença significativa entre os valores da DI_{50} dos grupos B e E, mas DI_{50} do grupo F foi bem menor em comparação com os grupos B e E (Tabela 3). Os títulos de DI_{50} para IgG1 no grupo B, E e F calculados foram 1/1923; 1/1701; 1/4514 respectivamente (Figura 11). Sendo assim, é possível que a vacina de raiva sem adjuvante tenha uma resposta Th2, muito semelhante à vacina associada ao EL28, mas não superando os valores da vacina associada ao $Al(OH)_3$. A Figura 12 mostra a coloração pela presença de anticorpos rábicos nas amostras de soro de camundongos pelos grupos B (antígeno rábico) e E (antígeno rábico + EL28) para IgG1 na placa de ELISA e sem coloração para o controle negativo (CN) e grupo A (solução salina)

Figura 11 – IgG1: os grupos experimentais foram constituídos pelo grupo B: VRI, grupo E: VRI + EL28, grupo F: VRI + $Al(OH)_3$ com valores de DI_{50} de $5,2 \times 10^{-4} \mu L$ ($IC_{95\%}$ $3,33 \times 10^{-4}$ até $8,12 \times 10^{-4}$); $5,9 \times 10^{-4} \mu L$ ($IC_{95\%}$ $2,56 \times 10^{-4}$ até $1,35 \times 10^{-3}$); $2,2 \times 10^{-4} \mu L$ ($IC_{95\%}$ $5,04 \times 10^{-7}$ até $9,24 \times 10^{-2}$) respectivamente.

$P < 0,001$

*** $P < 0,001$

*

As comparações dos grupos que apresentaram DI_{50} de IgG1 específicas para o vírus rábico foram comparados pelo método de ANOVA aplicando se a

ferramenta de Bonferroni. Pela ANOVA os resultados apresentaram diferença significativa, e ao aplicar a ferramenta de Bonferroni verificamos que houve somente diferença significativa entre o grupo que recebeu antígeno rábico com $\text{Al}(\text{OH})_3$ (grupo F) em comparação aos grupos que receberam somente antígeno (grupo B) e o antígeno associado a EL28 (grupo E), enquanto que não houve diferença significativa entre os grupos B e grupo E (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação estatística (Método de Anova com ferramenta de Bonferroni) entre a DI50 dos anticorpos anti-rábicos IgG1 dos grupos experimentais (grupo B, E e F) testadas por ELISA indireto.

	IgG 1		
	GRUPO B	GRUPO E	GRUPO F
Grupo B	ND	Não	$P < 0,001$
Grupo E	Não	ND	$P < 0,001$
Grupo F	$P < 0,001$	$P < 0,001$	ND

ND: não determinado

Figura 12 - Fotografia da placa de ELISA para IgG1 (branco, sem anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase; grupo A, solução salina; grupo B, antígeno; e grupo E, antígeno associado a EL28)

5.3.4 Anticorpos IgG2a

Das amostras de soro de camundongos analisadas foram detectados os anticorpos IgG2a, cujos valores de DI50 para os grupos B, E e F foram $9,05 \times 10^{-3} \mu\text{L}$ (IC95% $5,37 \times 10^{-3}$ até $1,53 \times 10^{-2}$); $7,25 \times 10^{-3} \mu\text{L}$ (IC95% $4,31 \times 10^{-3}$ até $1,21 \times 10^{-2}$); $2,93 \times 10^{-3} \mu\text{L}$ (IC95% $1,93 \times 10^{-3}$ até $4,45 \times 10^{-2}$) respectivamente (Figura 13). Não houve diferencia significativa entre os valores da DI50 dos grupos B, E e F. Os títulos de DI50 para IgG2a no grupo B, E e F calculados foram 1/110, 1/138, 1/342; respectivamente (Figura 13).

Figura 13 – IgG2a: os grupos experimentais foram constituídos pelo grupo B: VRI, grupo E: VRI + EL28, grupo F: VRI + $\text{Al}(\text{OH})_3$ com valores de DI50 de $9,05 \times 10^{-3} \mu\text{L}$ (IC95% $5,37 \times 10^{-3}$ até $1,53 \times 10^{-2}$); $7,25 \times 10^{-3} \mu\text{L}$ (IC95% $4,31 \times 10^{-3}$ até $1,21 \times 10^{-2}$); $2,93 \times 10^{-3} \mu\text{L}$ (IC95% $1,93 \times 10^{-3}$ até $4,45 \times 10^{-2}$) respectivamente.

Os resultado estadístico das IgG2a analisadas pelo Método de Anova não deu diferença significativa, e com ajuda da ferramenta de Bonferroni, igualmente notamos que não houve diferença significativa entre os grupos B e F, nem grupos E e F nem grupos B e E (Tabela 4).

Tabela 4 – Comparação estatística (Método de Anova com ferramenta de Bonferroni) entre a DI50 dos anticorpos anti-rábicos IgG2a dos grupos experimentais (grupo B, E e F) testadas por ELISA indireto.

IgG 2a			
	Grupo B	Grupo E	Grupo F
Grupo B	ND	Não	Não
Grupo E	Não	ND	Não
Grupo F	Não	Não	ND

ND: não determinado

5.3.5 Análises da resposta Th1/Th2

Para avaliar o tipo de resposta Th1/Th2 foram determinadas a razão entre a DI50 da IgG2a com IgG1 (IgG2a/IgG1). Se o valor da razão for inferior a 1, há uma predominância de resposta tipo Th2; se for superior a 1, há uma predominância de resposta tipo Th1; e se for próximo a 1, há equilíbrio de resposta Th2 e Th1 (Quadro 3) (CRIBBS et al., 2003).

Quadro 3 – Valores da razão IgG2a/IgG1 para determinar o tipo de resposta Th.

IgG2a/IgG1 < 1	Resposta tipo Th2
IgG2a/IgG1 = 1	Equilíbrio de resposta Th2 e Th1.
IgG2a/IgG1 > 1	Resposta tipo Th1

Todas as formulações vacinais estudadas apresentaram uma razão IgG2a/IgG1 menor que um (< 1) neste caso a respostas predominante foi do tipo Th2 com baixos títulos de IgG2a (Tabela 5). Essas proporções de anticorpos IgG1 a IgG2a geradas em resposta à imunização da vacina de raiva forneceu a medida relativa da contribuição das respostas imunitárias humorais de tipo Th2 e Th1.

Tabela 5 – Isotipos de anticorpos rábicos às três semanas após a imunização de camundongos BALB/c jovens com vacinas vírus rábico inativado.

Relação IgG2a/IgG1				
	Log DI50 IgG2a	Log DI50 IgG1	Resultado	Tipo de resposta Th
Grupo B	-2,043	-3,284	0,622	Th2
Grupo E	-2,140	-3,231	0,662	Th2
Grupo F	-2,534	-3,655	0,693	Th2

Sendo assim, é observado que a vacina de raiva sem adjuvante tem uma resposta Th2, muito semelhante à vacina associada a EL28, mas não superando os valores da vacina associada ao $\text{Al}(\text{OH})_3$.

A imunização com vírus inativados gera uma resposta Th2. Em geral, as respostas Th2 estão associadas a reações alérgicas e infecções com parasitas extracelulares, como helmintos, bem como vacinas adjuvantes com sais de alumínio. A prevalência de respostas Th2 pode desempenhar algum papel em uma evolução mais rápida da infecção do vírus da imunodeficiência humana. O paradigma Th1/Th2 também fornece o entendimento para o desenvolvimento de novos tipos de vacinas contra agentes infecciosos e de novas estratégias para a terapia de distúrbios alérgicos e autoimunes (CRIBBS et al., 2003; NICHOLLS; MADERA; HANCOCK, 2010).

5.4 RFFIT

As amostras de soros dos camundongos imunizados foram tiveram a sua potência determinada pelo teste de RFFIT através do FFD50, os resultados foram expressos em (UI/mL) para cada grupo experimental, uma vez que foi comparado com um soro de referência de 1,0 UI/mL. Todos os grupos experimentais foram analisados, porém somente: o grupo B: VRI, o grupo E: VRI + EL28 e o grupo F: VRI + $\text{Al}(\text{OH})_3$ apresentaram anticorpos neutralizante. Os demais grupos, como esperado não apresentaram anticorpos neutralizantes da infectividade celular. O soro de referência, fornecido pelo NIBSC, como padrão internacional de referência já que sua atividade biológica (1.0 UI/mL) é conhecida. Houve diferença significativa na potência do grupo B e o grupo E, o que indica aumento da especificidade dos anticorpos neutralizantes produzidos pelo EL28. Por outro lado, como se esperava, o grupo F com $\text{Al}(\text{OH})_3$ teve maiores quantidades de anticorpos neutralizantes.

Como a evidência experimental disponível indica que a eliminação de vírus rábicos é dependente de anticorpos neutralizantes anti-rábicos e não de mecanismos mediados por células CTLs, inclusive a indução da resposta Th2 pode ser mais benéfica e segura do que uma resposta Th1. No teste de RFFIT, resposta imunológica da vacina de raiva associada ao EL28 incrementou na potência dos anticorpos neutralizantes para 1,7 UI/mL, em comparação da

vacina sem adjuvante que deu 0,4 UI/mL (recomendado de 0,5 UI/mL), após a dose de reforço aos 28º dia da imunização (Figura 14). O título de 1,7 UI/mL pelo EL28 é um título mínimo adequado contra a raiva humana como recomendado pela WHO. Esses resultados mostram o efeito imunológico pelo EL28 na potência dos anticorpos neutralizantes contra os vírus rábicos.

Figura 14 – Comparação do RFFIT entre a referência internacional (INT. REF) ou soro de referência e os grupos B, E e F.

** $P < 0,001$

*** $P < 0,001$

A concentração de EL28 (100 μ M/dose) empregada no experimento, foi determinada seguindo os estudos realizados pelo Monte e colaboradores, aonde estudaram a OVA associada ao EL28 e descobriram concentrações elevadas de anticorpos IgG específicas a OVA (MONTE et. Al., 2016). Não entanto, nossos resultados experimentais através do ELISA indireto, na vacina associada ao EL28, não tiveram aumento de anticorpos IgG totais ao vírus rábico, em comparação a vacina sem adjuvante. Então, com esses resultados verificamos que o EL28, não tem uma função adjuvante.

Os adjuvantes associados para cada antígeno atuam no sistema imunológico de forma única e independentemente. O EL28 somente foi estudado em uma vacina de raiva, mas deve ser associado a outros antígenos reais para estudar suas funções imunológicas no organismo, pois existem estudos *in vitro* e em camundongos, como potente imunoestimulante (MONTE et. Al., 2016).

Existem poucos estudos sobre adjuvantes peptídicos em vacinas. O aumento de quatro vezes maior da potência dos anticorpos neutralizantes da vacina de raiva associada ao EL28 em comparação a vacina sem adjuvante nos indica que existe uma rota nova que o EL28 realiza para estimular o sistema imune adaptativo com aumento de anticorpos neutralizantes.

Patel e colaboradores estudaram o efeito adjuvante dois peptídeos, 5mer4 (KWCEC (Lys Trp Cys Glu Cys, SEQ ID N ° 4)) e 5mer7 (KYMCW (Lys Tyr Met Cys Trp, SEQ ID N°12)) associadas a vacina de DNA contra a influenza, aonde viram uma resposta com células T e anticorpos neutralizantes elevados. Esse perfil segue nosso peptídeo EL28. Assim, com esses resultados verificamos que o EL28, apenas tem uma função imunoestimulante. Existem vacinas de DNA virais (ENGERIX-B e FLUVIRAL®) que associadas a adjuvantes peptídicos aumentam a resposta imune adaptativa, em base isso, esses antígenos podem ser associados ao EL28, dessa maneira estudar suas propriedades imunoestimulantes e ampliar o conhecimento sobre o EL28 (PATEL et al., 2009).

Nossos resultados devem ser verificados, realizando estudos de desafio da vacina de raiva associadas ao EL28.

Próximos estudos do EL28 podem-se utilizar doses menores ou iguais a 100 µM de EL28 por dose em vacinas rábicas, e inclusive associa-as a outros adjuvantes, para continuar estudando ao EL28. Nós apenas usamos o peptídeo EL28, não entanto, não usamos o peptídeo EL28 –cpp) (YGRKKRRQRRR; cpp) o qual poderia ter funções imunoestimulantes se o associamos ao mesmo antígeno rábico no experimento.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- O EL28 tem a função imunoestimulante, mas não tem função adjuvante.
- O EL28, pelo método de ELISA, conclua-se que mantém a resposta imune humoral bem semelhante à vacina de raiva sem adjuvante.
- O EL28, pelo método de RIFFT, aumentou em quatro vezes a potência (especificidade) dos anticorpos rábicos neutralizantes da resposta imunológica em comparação à vacina de raiva sem adjuvante.
- O EL28 poderia contribuir nas vacinas que precisem da resposta Th2.
- O EL28 poderia ter uma maior eficiência se associado a um adjuvante já estabelecido que facilitasse o desenvolvimento de vacinas com maior potência e segurança.
- Sugere-se que o EL28 pode se testar com outros antígenos vacinais.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

- AGUILAR, J. C.; RODRÍGUEZ, E. G. Vaccine adjuvants revisited. **Vaccine**, v. 25, n.19, p. 3752-3762, 2007.
- AWATE, SUNITA, LORNE A. BABIUK, GEORGE MUTWIRI. Mechanisms of Action of Adjuvants. **Frontiers in Immunology**, v. 4 n. 114, 2013.
- BACCALA, R. et. al., TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. **Nature Medicine**, v. 13, n. 5, p. 543-551, 2007.
- BHARDWAJ, N., GNJATIC S., SAWHNEY N.B., TLR AGONISTS: Are They Good Adjuvants? **Cancer journal (Sudbury, Mass)**, v.16, n. 4, p. 382-391, 2010.
- BRACIALE, T.J., YOUNG S.H., Immunity to Viruses. **Immunological reviews**, v. 255, n. 1, set. 2013.
- BRASIL. Portaria nº 228, de 25 de outubro de 1988. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece instruções referentes ao Controle da Produção e Comercialização de Vacinas e Soro Anti-rábico para uso veterinário. Diário Oficial da União, Brasília, 31 oct. 1988.
- BOWDISH D. M., DAVIDSON D. J., LAU Y. E., LEE K., SCOTT M. G., HANCOCK R. E. **Impact of LL-37 on anti-infective immunity**. Journal of Leukocyte Biology, v. 77, n. 4, p. 451-459, 2005.
- CALABRO, S. et. al., Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. **Vaccine**, v. 29, n. 9, p.1812-1823, 2011.
- CARLSSON N. et. al., Quantification of protein concentration by the Bradford method in the presence of pharmaceutical polymers. **Analytical Biochemistry**, v. 411, n. 1, p. 116-121, 2011.
- CRIBBS D.H, et al. Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with β -amyloid. **International immunology**, v.15, n. 4, p. 505-514, 2003
- DAY, M. J. et al. A kinetic study of histopathological changes in the subcutis of cats injected with non-adjuvanted and adjuvanted multi-component vaccines. **Vaccine**, v. 25, n. 20, p. 4073–4084, 2007.
- DEAN, D.J.; ABELSETH, M.K. The fluorescent antibody test. In: World Health Organization. **Laboratory techniques in rabies**. 3rd ed. Geneva, 1973. p. 73-84.
- DE GREGORIO, E.; D'ORO, U.; WACK, A. Immunology of TLR-independent vaccine adjuvants. **Current Opinion in Immunology**, v.21, n.3, 2009.
- DEIM, Z.; PALMAI, N.; CSERNI, G. Feline vaccine-associated fibrosarcoma

induced by aluminium compound in two cats: short communication. **Acta veterinaria Hungarica**, v. 56, n. 1, p. 111–116, 2008.

DEVILLE, S. et al. Adjuvant Formulation for Companion Animals Vaccines. **Procedia in Vaccinology**, v. 4, p. 104–112, 2011.

DIETZSCHOLD, B. et al. Concepts in the pathogenesis of rabies. **Future virology**, v. 3, n. 5, p. 481–490, 2008.

DONG, J. C.; KOBINGER, G. P. Hypothesis driven development of new adjuvants. **Hum Vaccin Immunother**, v. 9, n. 4, p. 808-811, 2013.

FEYSSAGUET, M. et al. Multicenter comparative study of a new ELISA, PLATELIA™ RABIES II, for the detection and titration of anti-rabies glycoprotein antibodies and comparison with the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) on human samples from vaccinated and non-vacc. **Vaccine**, v. 25, n. 12, p. 2244–2251, 2007.

FRANCHI, L.; NÚÑEZ, G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1 β secretion but dispensable for adjuvant activity. **European Journal Immunology**, v.38, n.8, p. 2085-2089, 2008.

GLENNY A. T., POPE C. G., WADDINGTON H., WALLACE U. Immunological notes. XVI1–XXIV. **Journal Pathology Bacteriology**, v. 29, n. 31, 1926.

HAMMARLUND, E. et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. **Nature Medicine**, v. 9, n. 9, p. 1131-1137, 2003.

HANCOCK RE, SAHL HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551 – 1557, 2006.

HEEGAARD, P. M., et al. Adjuvants and delivery systems in veterinary vaccinology: current state and future developments. **Archives of Virology**, v. 156, n.2, p. 183–202, 2011.

JOHNSON N, CUNNINGHAM AF, FOOKS AR. The immune response to rabies virus infection and vaccination. **Vaccine**, v. 28, n. 23, p. 3896-3901, 2010.

JOHNSON N et al. Inflammatory responses in the nervous system of mice infected with a street isolate of rabies virus. **Dev Biol**, v. 131, p. 65-72, 2007.

KANDUC, D. “Self-nonself” peptides in the design of vaccines. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 28, p. 3283 – 3289, 2009

KIMURA, H. et al. New Insights into the Function of the Immunoproteasome in Immune and Nonimmune Cells. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, 2015.

KLASSE, P. J. Neutralization of Virus Infectivity by Antibodies: Old Problems in New Perspectives. **Advances in Biology**, v. 2014, p. 1-24, 2014.

KOSTENSE, S. et al. Validation of the rapid fluorescent focus inhibition test for rabies virus-neutralizing antibodies in clinical samples. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 7, p. 3524–3530, 2012.

KOYAMA, S. et al. Innate immune response to viral infection. **Cytokine**, v. 43, n. 3, p. 336-341, 2008.

KRÄMER, B. et al. The rapid fluorescent focus inhibition test is a suitable method for batch potency testing of inactivated rabies vaccines. **Biologicals**, v. 37, n. 2, p. 119–126, 2009.

LAMBRECHT, B. N.; KOOL M.; WILLART M.; HAMMAD H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. **Current opinion in Immunology**, v. 21, p. 1-7, 2009.

LINDBLAD, E. B. Aluminium adjuvants—in retrospect and prospect. **Vaccine**, v. 22, n. 27–28, p. 3658–3668, 2004.

LUCCHESI, G. et al. Peptidology: short amino acid modules in cell biology and immunology. **Amino Acids**, v. 33, n. 4, p. 703 - 707, 2007

MAISONNEUVE, C. et al. Unleashing the potential of NOD- and Toll-like agonists as vaccine adjuvants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 34, p. 12294–9, 2014.

MARRACK, P.; MCKEE, A. S.; MUNKS, M. W. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 4, p. 287–93, 2009.

MARTINI, M. et al., IFN-gamma-mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer. **Vaccine**, v. 28, n. 20, p. 3548-3557, 2010.

MESLIN, F.X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4th ed., Geneva: World Health Organization. 1996.

MINISTERIO DA SAÚDE. Descrição da Doença. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/752-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/raiva/11427-descricao-da-doenca>. Acesso em: 04 de junho de 2017.

MONTE, E. R. C. et al. Interferon-gamma activity is potentiated by an intracellular peptide derived from the human 19S ATPase regulatory subunit 4 of the proteasome. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 74–82, 2017.

NICHOLLS, E. F., MADERA L., HANCOCK R.E. Immunomodulators as adjuvants for vaccines and antimicrobial therapy. **Annals of The New York Academy Of Sciences**, v. 1213, n. 1, p. 46-61, 2010.

OFFIT, P. A.; JEW, R. K. Addressing Parents' Concerns: Do Vaccines Contain Harmful Preservatives, Adjuvants, Additives, or Residuals?. **Pediatrics**, v. 112, n. 6, 2013.

OKDA, F. et al. Development of an indirect ELISA, blocking ELISA, fluorescent microsphere immunoassay and fluorescent focus neutralization assay for serologic evaluation of exposure to North American strains of Porcine Epidemic Diarrhea Virus. **BMC veterinary research**, v. 11, p. 180, 2015.

PATEL A., KOBASA D., KOBINGER G., BABIUK S. **Peptide adjuvants** US 8404243 B2, (30 nov. 2009).

PATEL, A. et al. Pentamers not found in the universal proteome can enhance antigen specific immune responses and adjuvant vaccines. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43802, 2012.

PETROVSKY, N.; AGUILAR, J. C. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. **Immunology and Cell Biology**, v. 82, p. 488–496, 2004.

PULMANAUSAHAKUL, R. et al. The glycoprotein and the matrix protein of rabies virus affect pathogenicity by regulating viral replication and facilitating cell-to-cell spread. **Journal of virology**, v. 82, n. 5, p. 2330–8, 2008.

RAMAKRISHNAN, M. A, Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. **World Journal of Virology**, v. 5, n. 2, p. 85–86, 2016

RASMUSSEN, S. B. et al; Type I Interferon Production during Herpes Simplex Virus Infection Is Controlled by Cell-Type-Specific Viral Recognition through Toll-Like Receptor 9, the Mitochondrial Antiviral Signaling Protein Pathway, and Novel Recognition Systems. **Journal of Virology**, v. 81, n. 24, p. 13315–13324, 2007.

REED, S. G. et al. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 1, p. 23–32, 2009.

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 6, p. 327–343, 2002.

SERVAT, A. et al. A quantitative indirect ELISA to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic and wild carnivores. **Journal of Immunological Methods**, v. 318, n. 1–2, p. 1–10, 2007.

SHIN, E-C. et al. Virus-Induced Type I IFN Stimulates Generation of Immunoproteasomes at the Site of Infection. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 11, p. 3006-3014, 2006.

SIVAKUMAR, S. M. et al. Vaccine adjuvants – Current status and prospects on controlled release adjuvancity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 19, n. 4, p. 197–206, 2011.

SOKOL, F.; STANCEK, D.; KOPROWSKI, H. Structural Proteins of Rabies Virus. **Journal of Virology**, v. 7, n. 2, p. 241–249, 1971.

TOUSSI, D.N.; MASSARI, P. Immune Adjuvant Effect of Molecularly-defined Toll-Like Receptor Ligands. **Vaccines**, v. 2, n. 2, p. 323-353, 2014.

VAN REGENMORTEL, M. H. Specificity, polyspecificity, and heterospecificity of antibody-antigen recognition. **Journal of Molecular Recognition**, v. 27, n. 11, p. 627-639, 2014.

WOODWARD, K. N. Origins of injection-site sarcomas in cats: the possible role of chronic inflammation-a review. **ISRN veterinary science**, v. 2011, p. 210982, 2011.

VASCELLARI, M. et al. Fibrosarcomas at Presumed Sites of Injection in Dogs : Characteristics and Comparison with Non-vaccination Site Fibrosarcomas and Feline Post-vaccinal Fibrosarcomas. **Journal Veterinary of Medicine**, v. 50, c. 6, p. 286–291, 2003.

VOLLER, A.; BARTLETT, A.; BIDWELL, D. E. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. **Journal of Clinical Pathology**, v. 31, p. 507–520, 1978.

ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 21.2016-P516

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**Utilização de peptídeo intracelular (EL28) como imunoestimulante da vacina de raiva**" (Protocolo CEUA/FCF/516), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Melissa Mercedes Torres Chipana**, sob orientação do(a) **Prof. Dr. Marco Antonio Stephano**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de **18 de março de 2016**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 22 de março de 2016.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP