

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Novos adjuvantes: determinação do perfil
imunomodulador do polissacarídeo xantana
produzido por *Xanthomonas arboricola* pv. pruni 106**

Rodrigo Andrade Schuch

Pelotas, 2017

Rodrigo Andrade Schuch

**Novos adjuvantes: determinação do perfil imunomodulador do polissacarídeo
xantana produzido por *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* 106**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Biotecnologia).

Orientadora: Dr^a. Daiane Drawanz Hartwig

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S383n Schuch, Rodrigo Andrade

Novos adjuvantes : determinação do perfil imunomodulador do polissacarídeo xantana produzido por *Xanthomonas arboricola* pv Pruni 106 / Rodrigo Andrade Schuch ; Daiane Drawanz Hartwig, orientadora. — Pelotas, 2017.

62 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Vacinas. 2. Goma xantana. 3. Ovalbumina. 4. Resposta imunológica. I. Hartwig, Daiane Drawanz, orient. II. Título.

CDD : 579.327

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Sibele Borsuk (UFPel, CDTec)

Prof. Dr. Sérgio Jorge (UFPel, CDTec)

Prof. Dr^a. Vanusa Pousada da Hora (FURG, Faculdade de Medicina)

Prof. Dr^a. Daiane Drawanz Hartwig (Orientador, UFPel, Instituto de Biologia)

*“Dedico essa dissertação à minha família.
Sem eles, não teria chegado até aqui”.*

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de realizar um curso de mestrado de qualidade;

À minha orientadora, Daiane Drawanz Hartwig, pela paciência, cobrança e confiança em mim depositada durante a realização dos experimentos, pelo incentivo e por todos os conhecimentos que me foram transmitidos;

À minha família pelo apoio durante esse percurso acadêmico;

Aos amigos Leonardo Monte e Thaís Collares pela auxílio e amizade durante os experimentos realizados;

Aos amigos do Laboratório de Vacinologia, pela ajuda durante esse período, estímulo e pelo convívio agradável;

Aos amigos do Biotério Central pela dedicação, disponibilidade e cuidados com os animais de experimentação, fundamentais neste e em outros trabalhos;

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite e pela contribuição na elaboração do documento final;

Aos demais amigos, colegas, funcionários e professores do Núcleo de Biotecnologia pela boa convivência, amizade e aprendizado;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

Muito obrigado!

“Science may set limits to knowledge, but should not set limits to imagination”

Bertrand Russell

Resumo

SCHUCH, Rodrigo A., **Novos adjuvantes: determinação do perfil imunomodulador do polissacarídeo xantana produzido por *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* 106**. 2017. 62f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O sucesso na produção de vacinas seguras, eficazes e que geram memória imunológica está diretamente relacionado com a característica do adjuvante, responsável por aumentar e/ou modular a resposta imune. Vários compostos apresentam atividade adjuvante, incluindo polissacarídeos, os quais desempenham papéis importantes na resposta imune. Dentre eles, destacamos a goma xantana, um polissacarídeo que é produzido pelo gênero *Xanthomonas* spp., uma bactéria fitopatogênica. Esse polissacarídeo vêm sendo explorado por possuir propriedades adjuvante. Porém, aspectos relativos ao seu mecanismo imunomodulador permanecem inexplorados. Assim, o presente estudo avaliou a resposta imunológica induzida pela goma xantana associada com antígeno proteico modelo, a ovalbumina (OVA), em camundongos BALB/c imunizados subcutaneamente. Sete animais por grupo foram divididos em: OVA-xantana (0,5% v/v), OVA-Alhydrogel (15% v/v), OVA-salina e salina. Após o regime de imunização, foi avaliada a produção de anticorpos (IgG1, IgG2a, IgG2b, e IgG3) e citocina IFN- γ em esplenócitos através de ensaio ELISA indireto. Além disso, foi investigada a citotoxicidade *in vitro* da xantana (0,1 a 1% v/v) em linhagem celular de fibroblastos de embrião de camundongo NIH/3T3, pelo ensaio de MTT e ensaio de captura de iodeto de propídio. Os camundongos imunizados com ovalbumina-xantana exibiram maiores respostas de anticorpo IgG1 comparado aos imunizados com ovalbumina sem adjuvante ($P < 0,05$). Além disso, o polissacarídeo xantana foi capaz de aumentar a produção de IFN- γ ($P < 0,05$) e não apresentou efeitos de citotoxicidade em células de fibroblastos de camundongos NIH/3T3, demonstrando o potencial da utilização da xantana como adjuvante vacinal combinado com antígenos proteicos.

Palavras-chave: Vacinas, goma xantana, ovalbumina, resposta imunológica.

Abstract

SCHUCH, Rodrigo A. **New adjuvants: determination of the immunomodulatory profile of xanthan polysaccharide produced by *Xanthomonas arboricola* pv. *Pruni* 106**. 2017. 62f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The successful production of new, safe and effective vaccines that generate immunological memory is directly related to adjuvant feature, which is responsible for increasing and/or modulating the immune response. Several compounds display adjuvant activity, including carbohydrates. One such carbohydrate is xanthan gum, a polysaccharide that is produced by the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas* spp. This polysaccharide has been explored for having adjuvant properties. However, aspects related to its immunomodulatory mechanism remain unexplored. This study evaluated the immune response induced by xanthan gum associated with ovalbumin (OVA) in BALB/c mice, that were subcutaneously immunized. Seven animals were divided into: OVA-xanthan (0.5% v/v), OVA-Alhydrogel (15% v/v), OVA-saline and saline. After the immunization regimen, the antibody production (IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3) and assessed the levels of INF- γ in the splenocyte culture using ELISA indirect. Furthermore, we investigated in vitro cytotoxicity of xanthan (0.1-1% v/v) in the embryo fibroblasts cell line of the NIH/3T3 mouse by MTT assay and propidium iodide uptake assay. The mice immunized with ovalbumin plus xanthan gum exhibited higher antibody IgG1 responses than those immunized with the ovalbumin without adjuvant. Furthermore, the xanthan polysaccharide was capable of increasing the immunogenicity of antigens by producing INF- γ and did not exhibit cytotoxicity effects in NIH/3T3 mouse fibroblast cells, demonstrating the potential of using xanthan as a vaccine adjuvant combined with protein antigens.

Keywords: Vaccines, xanthan gum, ovalbumin, immune response.

Lista de Figuras

Figura 1. <i>Timeline</i> com importantes eventos na vacinologia.	9
Figura 2. Diferentes abordagens de atuação dos ajuvantes na resposta imunológica	22
Figura 3. Estrutura do polissacarídeo extracelular de <i>Xanthomonas</i> spp.....	29

Lista de Tabelas

Tabela 1. Mecanismo de ação dos adjuvantes licenciados para vacinas.	23
Tabela 2. Considerações sobre o adjuvante ideal.	25
Tabela 3. Avaliações da capacidade adjuvantes da xantana.	29

Lista de Abreviaturas

APCs	<i>Antigen-presenting cells</i>
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing CARD</i>
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i>
CD40	<i>Cluster of differentiation 40</i>
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i>
CD80	<i>Cluster of differentiation 80</i>
CD86	<i>Cluster of differentiation 86</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
IgG	Imunoglobulina G
INF- γ	<i>Interferon gama</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MDP	Muramildipeptídeo
MHC	<i>Major histocompatibility complexe</i>
MPL	Monofosforil lipídeo A
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NAPL3	<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3</i>
NF- κ B	<i>Factor nuclear kappa B</i>
NK	<i>Células natural killer</i>
NLRP3	<i>Gene NAPL3</i>
NOD2	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2</i>
OVA	Ovalbumina
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RRP	Receptores de reconhecimento de padrões
T _H 1	Linfócito T _H 1 auxiliar
T _H 2	Linfócito T _H 2 auxiliar
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i>

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. Perspectiva histórica: Vacinas clássicas e adjuvantes.....	16
2.2. Mecanismo de ação e classificação dos adjuvantes.....	19
2.3. Desenvolvimento de novos adjuvantes: Imunogenicidade x segurança	25
2.4. Adjuvantes a base de carboidratos: xantana e seu potencial	27
3. HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	31
3.1. Hipótese	31
3.2. Objetivo Geral	31
3.3. Objetivos Específicos	31
4. CAPÍTULOS	32
4.1 Artigo – <i>The Use of Xanthan Gum as Vaccine Adjuvant: An Evaluation of Immunostimulatory Potential in BALB/c Mice and Cytotoxicity in Vitro</i>	32
5. DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS	57
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	58
7. REFERÊNCIAS.....	59

1. INTRODUÇÃO GERAL

A vacinação é uma das estratégias mais efetivas na prevenção e erradicação de doenças infecciosas, sendo responsável por promover o aumento da expectativa de vida e indiretamente a diminuição da pobreza em países de baixa renda (Rappuoli et al. 2011). As vacinas tradicionalmente compostas por micro-organismos atenuados ou inativados costumam ser efetivas e protetoras, pois possuem as propriedades do patógeno preservadas (Lee & Nguyen 2015). Porém, devido a considerações de segurança, novas vacinas estão sendo desenvolvidas a partir de antígenos purificados, os quais são, na maioria das vezes, fracos imunógenos (Guy 2007).

Nas últimas décadas, pesquisas na área da vacinologia vêm apontando como alternativa a utilização de partículas virais ou subunidades de antígenos recombinantes como promissoras tecnologias, tanto para uso profilático, quanto terapêutico (Reed et al. 2013). Porém, a imunização com antígenos purificados normalmente resulta na indução de uma resposta imunológica baixa em termos de anticorpos e mediada por linfócitos T, indispensável para geração de memória imunológica contra patógenos (De Gregorio et al. 2013).

Nesse sentido, existem os adjuvantes, compostos capazes de aumentar e/ou modular a imunogenicidade de um antígeno particular. O termo adjuvante deriva de *adjuvare*, do latim, "socorrer" ou "reforçar" (Reed et al. 2009). Existe uma variedade de compostos com propriedades adjuvantes (sais minerais, emulsões, micropartículas, saponinas, componentes microbianos e lipossomas), os quais exercem suas funções através de diferentes mecanismos de ação (Reed et al. 2013; Guy 2007; Awate et al. 2013). Entre os mecanismos de ação, as características compartilhadas por esses compostos incluem: (1) aumentar a estabilidade biológica das vacinas, (2) aumentar a captura de antígeno pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), (3) ativar APCs maduras (por exemplo, células dendríticas), (4) induzir a produção de citocinas imunorreguladoras, (5) ativar inflamação e (6) induzir inflamação local, incluindo recrutamento de células (Coffman et al. 2010; Pasquale et al. 2015).

Em conjunto, essas características resultam em importantes pontos na eficiência das vacinas, como: redução na quantidade de antígeno e doses administradas, modulação correta da imunidade e estímulo da proteção e

34 soroconversão em populações especiais (idosos, indivíduos imunocomprometidos,
35 pessoas com doenças crônicas e recém-nascidos) (Rappuoli et al. 2011; Apostólico
36 et al. 2016).

37 Apesar de diversas formulações se encontrarem em estágios avançados de
38 desenvolvimento e licenciamento, apenas alguns conseguem satisfazer os requisitos
39 mínimos de segurança exigido nos testes clínicos (Christensen 2016). Sendo
40 majoritariamente utilizados de forma empírica, muitas vezes desencadeiam efeitos
41 indesejáveis, principalmente reações adversas como granulomas e abscessos (Mbow
42 et al. 2010).

43 As estruturas compostas por carboidratos desempenham papéis críticos no
44 sistema imunológico, possuindo um histórico de segurança e tolerabilidade devido à
45 fácil biodegradação e biotransformação (Rey-Ladino et al. 2011). Diversos
46 polissacarídeos originados de plantas e micro-organismos vêm sendo testados como
47 potenciais adjuvantes em vacinas, reforçando tanto a imunidade humoral quanto
48 celular (Petrovsky & Cooper 2011). Esses compostos à base de hidratos de carbono
49 podem ser muito diferentes entre si (características físicas e químicas), resultando em
50 atributos imunológicos únicos (Shakya & Nandakumar 2013).

51 Dentre esses polissacarídeos, a xantana é um polissacarídeo extracelular
52 complexo produzido pelo gênero bacteriano fitopatogênico *Xanthomonas*, sendo
53 amplamente utilizado como um espessante ou agente de viscosidade em indústrias
54 alimentícias e farmacêuticas (Garcia-Ochoa et al. 2000). Este polissacarídeo é
55 constituído por uma cadeia principal à base de celulose, ligado a uma cadeia lateral
56 trissacarídeo de duas unidades de D-manose com resíduos alternados de ácido D-
57 glicurônico. As unidades de D-manose podem ainda ser acetiladas, com cerca de
58 metade apresentando resíduos de ácido pirúvico. Esses substituintes aniônicos
59 influenciam tanto as propriedades físicas quanto químicas da xantana (Erten et al.
60 2014).

61 Os primeiros relatos das propriedades adjuvantes intrínsecas da xantana
62 surgiram na década de 1980 (Ishizaka et al. 1983). Mais recentemente, foi avaliada
63 com êxito em formulações bioadesivas em forma de emulsão para imunização
64 intranasal contra o vírus Influenza (Bertram et al. 2010; Chiou et al. 2009). Além disso,
65 foi capaz de intensificar a imunogenicidade de antígenos recombinantes e geração de
66 proteção contra cepas patogênicas de *Leptospira interrogans* por via subcutânea
67 (Bacelo et al. 2014). No entanto, a resposta imune gerada por este polissacarídeo

quando empregado como adjuvante de vacina ainda não está elucidado. Com isso, a presente dissertação visou a caracterização da resposta imune desencadeada pelo polissacarídeo xantana.

Os dados gerados nesta dissertação estão apresentados na forma de artigo científico. O artigo foi submetido ao periódico BioMed Research International e avalia o potencial imunoestimulatório do polissacarídeo xantana produzido por *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* (strain 106) como adjuvante vacinal em combinação com o antígeno proteico modelo ovalbumina (OVA) por via subcutânea. O uso da xantana demonstrou aumentar a imunogenicidade do antígeno tanto em resposta humoral (anticorpos IgG) quanto celular (proliferação de esplenócitos e secreção de INF- γ). Em adição, testes de citotoxicidade *in vitro* revelaram sua biocompatibilidade, pré-requisito essencial no desenvolvimento de novos adjuvantes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Perspectiva histórica: Vacinas clássicas e adjuvantes

A vacinação é uma das intervenções de saúde pública de maior sucesso já implementadas, sendo diretamente responsáveis por aumentar a expectativa de vida da população, a erradicação de doenças e indiretamente a diminuição da pobreza em países de baixa renda (Rappuoli et al. 2011; MacLennan & Saul 2014). Edward Jenner foi o primeiro pesquisador a demonstrar o processo de vacinação através de descobertas sobre o vírus da varíola bovina (*vaccínia*) em 1796 (revisado em Plotkin 2014).

Durante o século XIX, dezenas de vacinas contra patógenos de importância global foram desenvolvidas e testadas na prática clínica (Pasquale et al. 2015). Essas vacinas foram produzidas através de tecnologias de atenuação ou inativação do patógeno. Apesar de serem efetivas, algumas destas vacinas apresentaram limitações com relação a eficácia ou reatogenicidade exacerbada, além de terem o potencial de reversão da atenuação, levando ao desenvolvimento de doença em casos de inativação incompleta de bactérias ou vírus (Cherry 1996).

Esses fatores indesejáveis culminaram na utilização de novas abordagens mais seguras para produção de vacinas (Zepp 2010). O início do século XX foi marcado pelo desenvolvimento de novas técnicas de produção de vacinas, incluindo a identificação de toxinas bacterianas, o uso de cultura de células para propagação e atenuação de bactérias e o início dos primeiros programas sistemáticos nacionais de vacinação (Pasquale et al. 2015).

Consequentemente, o desenvolvimento da (1) vacina acelular (coqueluche) em 1981 (Sato & Sato 1999), (2) as novas técnicas de engenharia genética e desenvolvimento da vacina contra o vírus da Hepatite B (McAleer et al. 1984) e (3) a conjugação de peptídeos a polissacarídeos capsulares (Plotkin & Plotkin 2011) foram marcos do início da nova era da vacinologia. Dessa forma, cada vez mais busca-se o desenvolvimento de antígenos vacinais a partir de proteínas e peptídeos recombinantes purificados.

Essas vacinas contendo um número limitado de antígenos purificados possuem, geralmente, melhores perfis de segurança, quando comparadas com

vacinas vivas atenuadas ou inativadas. Porém, também são frequentemente menos imunogênicas, devido à carência de estimuladores de imunidade (Guy 2007). Nesse sentido, existem os denominados adjuvantes, compostos capazes de aumentar e/ou modular a imunogenicidade de um antígeno particular. O termo adjuvante deriva de *adjuvare*, do latim, "socorrer" ou "reforçar" (Reed et al. 2009).

O desenvolvimento dos adjuvantes ocorreu em paralelo ao das vacinas. Desde as primeiras tentativas de aumentar as respostas imunológicas contra antígenos particulados, diversos aditivos foram identificados e combinados com antígenos. A maioria dos sistemas adjuvantes desenvolvidos até o presente momento têm-se centrado em um destes dois mecanismos: ativação imune específica ou o efeito de entrega/depósito (Ott & Van Nest 2006).

Entre 1920 e 1940, o início da história do desenvolvimento dos adjuvantes se deu através do estudo de vacinas contendo subunidades de toxóides, os quais apresentavam imunogenicidade limitada (Apostólico et al. 2016). Nesse período, dois principais tipos de adjuvantes emergiram: os sais de alumínio (alum) e as emulsões em óleo-em-água (adjuvante de Freund) (Billiau & Matthys 2001). Em destaque, a primeira vacina com o adjuvante alum foi formulada com um co-precipitado de hidróxido de alumínio e toxóide causador da difteria. Subsequentemente, a utilização de métodos bem definido para adsorver os antígenos em solução aquosa padronizaram a utilização desse composto como adjuvante vacinal (revisado em Wen & Shi 2016). Foram relatados casos de toxicidade ocasional e moderada após vacinação. Porém, os níveis de toxicidade observados foram considerados aceitáveis em virtude da reduções dramáticas de doenças como a difteria e o tétano, devido a profilaxia gerada pela vacinação (Ott & Van Nest 2006). Este foi o principal adjuvante desenvolvido e utilizado em vacinas aprovadas para uso em humanos, os quais tiveram grande utilização entre 1940 e 1970.

O período entre 1970 a 1990 foi caracterizado pelo desenvolvimento dos adjuvantes sintéticos e da chamada "segunda-geração" de sistema de entrega/depósito (Ott & Van Nest 2006). Essencialmente, esses adjuvantes eram compostos de moléculas pequenas, muitas vezes derivadas de frações bacterianas e partículas veiculadas de dimensões semelhantes a bactérias ou vírus, contendo agonistas em interações mais complexas com diversos tipos de células (incluindo células de Langerhans, macrófagos e células dendríticas). Exemplos de moléculas extensivamente estudadas foi a MDP (Muramildipeptídeo), isolada de *Listeria*

monocytogenes, saponinas e lipossomos (O'Hagan & Singh 2003). A partir de 1980, embora o correlato de imunidade pelas vacinas priorizasse o títulos de anticorpos neutralizantes, muitas abordagens se concentravam na estimulação de efeitos depósitos em APCs, enfatizando tanto a quimiotaxia quanto a absorção pelos macrófagos. Assim, a investigação em direção à sistemas de micro/nanopartículas como “*delivey systems*” associados a antígenos se torna mais intensa (Pasquale et al. 2015).

A produção e licenciamento da primeira vacina recombinante contra hepatite B (Valenzuela et al. 1982) e descoberta do vírus HIV (Barre-Sinoussi et al. 1983; Gelmann et al. 1983) desencadeou uma inédita onda de investigação sobre adjuvantes adequados para a proteção em vacinas de subunidade. Nos últimos 20 anos, cinco adjuvantes foram incluídos em vacinas licenciadas (Figura 1). O adjuvante mais comumente administrado depois dos sais de alumínio, consiste em emulsões de óleo-em-água com a ajuda de óleos com reatogenicidade melhorada em comparação com adjuvante de Freund original. Estas emulsões são capazes de induzir tanto respostas imune humoral quanto celular (Fox & Haensler 2013).

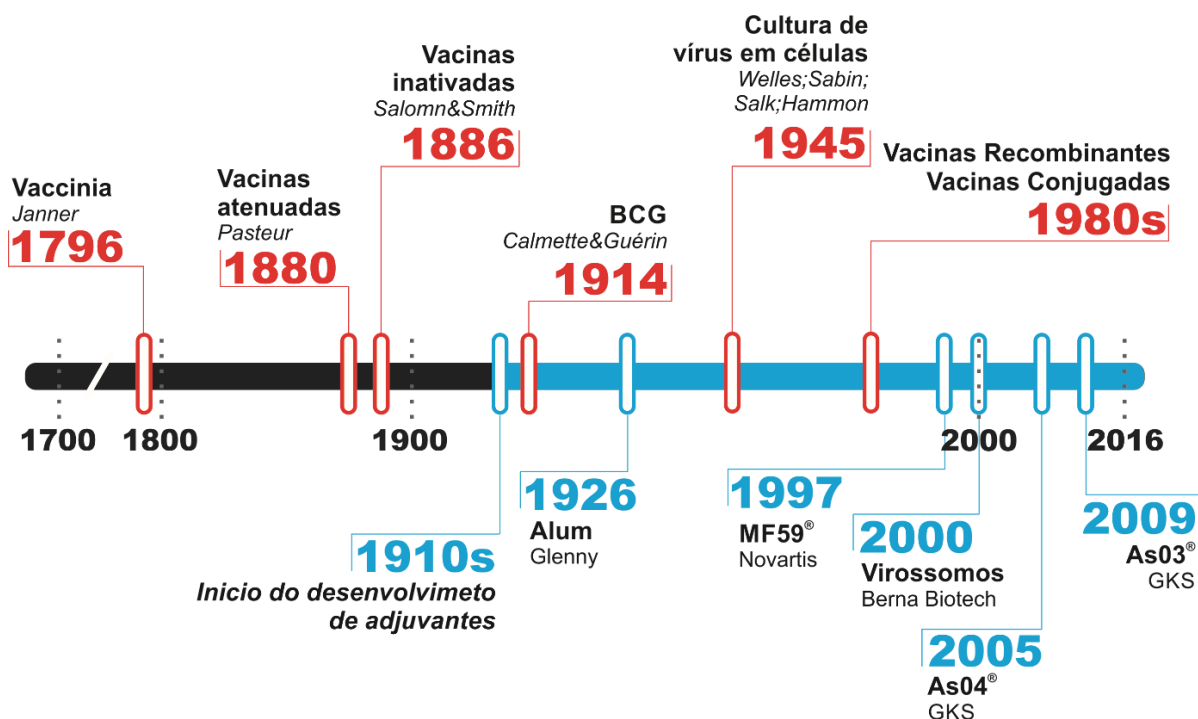


Figura 1. Timeline dos importantes eventos na vacinologia. Em 1796, os trabalhos envolvendo o estudo da varíola bovina (vaccínia) iniciam a era da vacinologia, passando por grandes avanços, incluindo o desenvolvimento de métodos de atenuação (1880 e 1914) e inativação (1886) de micro-organismos. A partir de 1910, os adjuvantes vacinais ganham destaque dentro da composição das vacinas, com

especial atenção aos sais de alumínio, culminando no licenciamento do primeiro adjuvante para uso em humanos em 1926. O estudo de cultura de vírus (1945) e o posterior desenvolvimento de vacinas recombinantes reforçavam a necessidade da existência de adjuvantes capazes de produzir respostas imune celulares e aumentar a imunogenicidade de antígenos purificados. Porém, somente em 1997 foi aprovado um novo adjuvante vacinal (MF59®). Em seguida, o desenvolvimento de novas pesquisas resultaram no licenciamentos dos virossomos (2000), As04® (2005) e As03® (2009), sendo até o momento, os adjuvantes inclusos na maioria das vacinas disponíveis.

O cuidado em relação à toxicidade continua a ser o principal fator na mudança das formulações nos ensaios clínicos. Adjuvantes potentes de baixa toxicidade foram desenvolvidos e obtiveram licenciamento comercial (MF59®) para a vacina da gripe (Gupta et al. 1993). Novos adjuvantes estão sendo projetados para superar os desafios relacionados a populações suscetíveis enfrentados pelas vacinas do século XXI (Wilson-Welder et al. 2009).

A expansão da compreensão do papel potencial dos adjuvantes trouxe rápidos avanços no desenvolvimento de vacinas (Stanberry & Strugnell 2011). As áreas de desenvolvimento de adjuvante e imunologia tornaram-se fortemente entrelaçadas a medida em que a caracterização de APCs, perfil de citocinas moduladoras de T_H2 e T_H1, MHC (complexo de histocompatibilidade principal) I e II e receptores TLRs (*toll like receptors*) estão sendo (Medzhitov & Janeway 2000).

Apesar do rápido progresso na área da vacinologia e adjuvantes, existem ainda lacunas na compreensão do sistema imunológico. Inclui-se a contribuição relativa das respostas inata e adaptativa para a proteção contra agentes patogênicos individuais e o modo preciso de ação dos adjuvantes. Informações de uma gama de novas áreas como a biologia de sistemas, transcriptoma e epigenética podem contribuir para a compreensão da vacinação e facilitar a avaliação do perfil de segurança de novas vacinas (Pasquale et al. 2015).

2.2. Mecanismo de ação e classificação dos adjuvantes

A resposta imune fisiológica contra um agente infeccioso - ou na imunização - pode ser dividida em: a resposta inata e a adaptativa. Quando a exposição a um corpo estranho ocorre, células efetoras da resposta imune inata, tais como macrófagos, monócitos, neutrófilos e células dendríticas, são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a superfície de patógenos (PAMPs). Para tal função,

existem os denominados receptores de reconhecimento de padrões (RRP), capazes de distinguir o agente como uma ameaça (Ishii et al. 2008).

O reconhecimento de um agente patogênico em potencial desencadeia uma série complexa de eventos. Inclui-se o processo de fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas) e ativação do sistema complemento. Isso resulta em recrutamento celular, onde a soma dos eventos podem levar ao desenvolvimento de sinais e sintomas clínicos de inflamação local (Iwasaki & Medzhitov 2015).

Após o processamento antigênico pelas APCs, tais como as células dendríticas, ocorre um processo de maturação e migração para órgãos linfoides secundários. Esse processo leva a apresentação de antígenos nestas regiões aos linfócitos T, sendo um ponto importante durante a transição da resposta imune inata para adaptativa. A forma na qual a resposta imune inata direciona a resposta imune adaptativa tem profundas implicações para o tipo/qualidade de resposta secundária a um antígeno (Crotty 2014). Particularmente, diferentes subtipos celulares de linfócitos T CD4⁺ podem ser definidas por seu perfil de citocinas produzidos e pela habilidade em modular respostas de linfócitos B e T CD8⁺, desencadeando a denominada memória imunológica (Macallan 2017).

Existem distintos sinais necessários para iniciar uma resposta imune robusta. Esses sinais atuam sobre o sistema inato e adaptativo, e podem ser descritas como: (Sinal 0 e 1) reconhecimento antigênico de APCs, (Sinal 2) co-estimulação e (Sinal 3) diferenciação celular (Figura 2). Nesse sentido, os adjuvantes podem atuar nos diversos aspectos da resposta imune pelo emprego de um ou vários mecanismos de ação (Reed et al. 2013).

Dentre os mecanismos de ação, inclui-se: liberação controlada de antígeno (efeito depósito), estímulo na produção de citocinas e quimiocinas (recrutamento de células e inflamação local), aumento do ingresso de antígeno nas APCs, bem como sua ativação e posterior migração aos linfonodos periféricos. Consequentemente, podem estimular: (i) a produção de intermediários da resposta pró-inflamatória inicial, (ii) o aumento da expressão de receptores MHC (Complexo de Histocompatibilidade Principal) I e II de células fagocíticas e (iii) modulação de células T CD4⁺ e CD8⁺ citotóxico na transição da imunidade inata para adaptativa, considerado ponto-chave da eficiência de uma vacina (Awate et al. 2013).

235 Quanto a sua classificação, o termo adjuvante pode ter significados diferentes
236 dependendo de sua aplicação. Critérios diferentes podem ser usados para agrupar
237 diferentes adjuvantes permitindo uma comparação racional. Os adjuvantes podem ser
238 classificados segundo as suas propriedades físico-químicas, a origem e o mecanismo
239 de ação (Guy 2007; Awate et al. 2013). Com base nos seus mecanismos de ação, os
240 adjuvantes podem ser divididos em três grupos: sistemas de entrega (partículas),
241 moléculas imunomoduladoras e combinações dessas duas (Reed et al. 2013). Os
242 mecanismos de ação dos adjuvantes licenciados para vacinas estão sumarizados na
243 tabela 1.

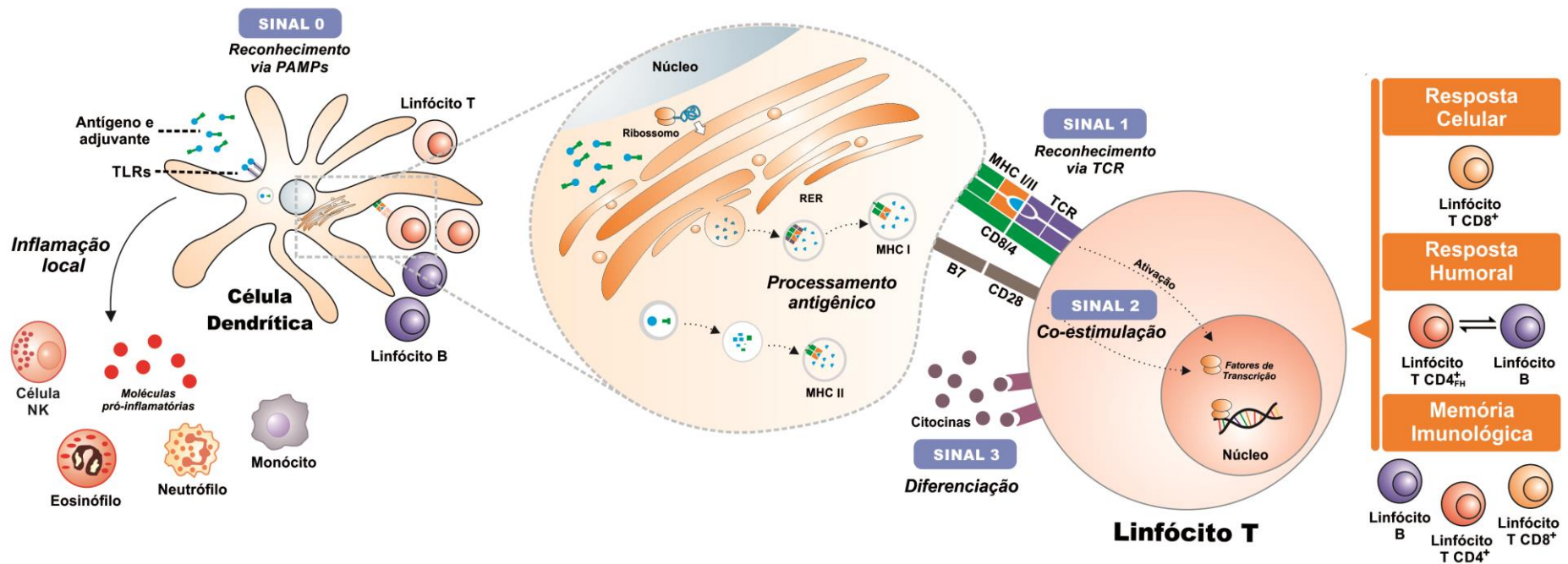


Figura 2: Diferentes abordagens de atuação dos adjuvantes na resposta imunológica. Os adjuvantes vacinais possuem grande impacto nas células do sistema imune inato, em especial, nas células apresentadoras de antígeno. A interação dos adjuvantes com essas células resulta na produção de quimiocinas e citocinas capazes de iniciar um processo inflamatório local. Esse processo é resultado de um reconhecimento (sinal 0) através de PAMPs (TLRs), recrutando células do sistema inato, como neutrófilos, eosinófilos, monócitos e células NK. Além disso, os adjuvantes podem desempenhar um efeito depósito, promovendo uma captura do antígeno de forma mais eficiente. O processo de ativação das células dendríticas resulta no aumento da capacidade de apresentação de antígenos via MHC I ou II através do processamento antigênico (sinal 1). Ao realizarem o processo de migração aos órgãos linfoides secundários, as células dendríticas ativadas podem interagir com células do sistema imune adaptativo (sinal 2 e 3). Essas células são denominadas linfócitos T, sendo responsáveis dessa forma por direcionarem a resposta celular (auxiliares ou efetora), humoral (linfócitos B) e memória imunológica, resultado do processo de ativação e diferenciação celular. Dessa forma, os adjuvantes podem atuar de diferentes formas na transição entre a resposta imune inata para adaptativa.

254 **Tabela 1.** Mecanismo de ação dos adjuvantes licenciados para vacinas.

Adjuvante	Classe	Componente	Resposta Inata	Resposta Adaptativa	Uso	Exemplo	Referência
Alum (1926)	SE	Sais de alumínio adsorvidos com antígeno	Sem efeito de depósito Efeito inflamatório local Aumento local de citocinas e quimiocinas Recrutamento de células (eosinófilos, monócitos e macrófagos) Aumento da apresentação de antígenos Estímulos via NLRP3 (NALP3) e ITAM	Anticorpos CD4 ⁺ T _H 2	Terapêutico Profilático	Vacina DTP	(De Gregorio et al. 2008; Oleszycka & Lavelle 2014)
MF59 (1997)	SE	Óleo escaleno	Sem efeito de depósito Recrutamento de células (neutrófilos, macrófagos e monócitos) Aumento local de citocinas e quimiocinas Independente de NLRP3 (NALP3) Dependente de ASC Independente de sinalização TLR Dependente de intermediário MyD88 para resposta humoral Ativação de células musculares	Anticorpos CD4 ⁺ T _H 1 CD4 ⁺ T _H 2	Terapêutico Profilático	Vacina Influenza H1N1, H5N1	(O'Hagan et al. 2013; O'Hagan et al. 1997)
Virossomo (2000)	SE	Lipossomos preparados com antígenos de vírus influenza	Ativação de APCs e receptores indutores de endocitose Desvio de degradação endossomal Aumento de apresentação de antígenos via MHC classe I e II	Anticorpos CD4 ⁺ T _H 1 CD4 ⁺ T _H 2 CD8 ⁺	Terapêutico Profilático	Vacina Hepatite A	(Schwendener 2014; Moser et al. 2013)

AS04 (2005)	C	Monofosforil lipídeo A (MPL) derivado de <i>Salmonella minnesota</i> combinado com sais de alumínio	Ativação via TLR4 Aumento local de citocinas e quimiocinas Aumento do recrutamento celular (células dendríticas e monócitos)	Anticorpos CD4 ⁺ T _H 1	Terapêutico Profilático	Vacina HPV	(Garcon et al. 2007; Garcon et al. 2011)
AS03 (2009)	SE	Vitamina E (α-Tocoferol) Surfactante polisorvato 80 Óleo escelano	Aumento do recrutamento celular (granulócitos e monócitos) Aumento da memória imunológica Aumento transiente local de citocinas Capacidade adsorbtiva com antígenos	Anticorpos CD4 ⁺ T _H 1 CD4 ⁺ T _H 2	Profilático	Vacina Influenza H1N1	(Atmar & Keitel 2009; Garcon et al. 2012)

255 SE, sistema de entrega; C, combinação de molécula imunoestimulatória e sistema de entrega; ITAM, Imunoreceptor com motivos de ativação tirosina;
 256 NALP3 Proteína 3 com domínios NACHT, LRR e PYD; NLRP3, gene que codifica para NALP3; ASC, *apoptosis-associated speck-like protein containing*
 257 *CARD*;

2.3. Desenvolvimento de novos adjuvantes: imunogenicidade x segurança

Além da compreensão dos mecanismos imunológicos de ação dos adjuvantes, também existe uma percepção de que o uso de adjuvantes em vacinas necessita ser bem caracterizado. Embora muitos adjuvantes tenham sido desenvolvidos e testados em modelos pré-clínicos, poucos têm-se provado úteis para vacinas de uso humano (Hagan & Fox 2015), onde as principais limitações giram em torno de questões de segurança (Rappuoli et al. 2011). As características ideais de um adjuvante estão listadas da tabela 2.

Tabela 2: Considerações sobre o adjuvante ideal*.

Categoria	Subcategoria	Consideração
<i>Atividade biológica</i>	Segurança	Formulações seguras e efetivas em todos os grupos etários, contendo compostos metabolizáveis
	Rota de imunização	Preferência a rotas de fácil administração (mucosa)
	Economia de antígeno	Diminuir a dose de antígeno ou o número de imunizações
	Ampliação da resposta	Proteção contra diferentes cepas de um mesmo patógenos
	Resposta humoral	Aumentar ou prolongar a resposta através da produção de anticorpos neutralizantes
	Resposta celular	Induzir ou prolongar a resposta por linfócitos T CD4 ⁺ e/ou CD8 ⁺
	Qualidade da resposta imune	Promover o balanço correto da resposta imune via linfócito T CD4 ⁺
	Auxiliar resposta em sistemas imunes debilitados	Aumento da resposta imune em populações jovens, idosas ou imunocomprometidas
<i>Aspectos físico-químicos</i>	Materias	Compostos com alto grau de pureza, sustentabilidade e segurança; compostos de origem animal devem ser evitados devido a preocupações com doença
	Produção	Equipamentos e processos escalonáveis, transferíveis e capazes de produzir lotes consistentes
	Morfologia da partícula	Partículas menores do que 200 nm podem ter acesso aos linfonodos com mais facilidade do que partículas maiores; carga e estrutura química dos grupos de superfície são fatores cruciais para bioatividade; a presença de moléculas como manose pode aumentar a entrega de antígenos para as APCs
	Compatibilidade com o antígeno	O efeito da formulação do adjuvante na estrutura do antígeno deve ser caracterizado; geralmente, acredita-se que algum grau de associação do antígeno na formulação é preferido, apesar de associação direta não ser necessária para a atividade biológica

Estabilidade

Excipientes e ingredientes farmacêuticos ativos (APIs) devem manter a estrutura química e do tamanho das partículas, forma e aparência visual constante

*Adaptado de GUY, 2007; O'HAGAN, De GREGORIO, 2009; REED, 2013.

Considerando que a toxicidade dos adjuvantes foi reduzida sistematicamente através de esforços de pesquisa e desenvolvimento ao longo dos últimos 80 anos, esse fato está ligado ao aumento de barreiras de segurança envolvendo regulamentação. Os adjuvantes utilizados em formulações de vacinas profiláticas em populações saudáveis precisam ter perfis de segurança elevados. Além disso, o fato de que a maioria das vacinas hoje são administradas a crianças, aumentam ainda mais as preocupações com sua segurança (Ott & Van Nest 2006).

As avaliações pré-clínicas envolvem ensaios com o objetivo de caracterizar a segurança/imunogenicidade, incluindo imunogenicidade humoral (títulos de anticorpos, subclasses, avides e neutralização) e celular (produção de citocinas, ensaios de proliferação e fenotipagem celular). Se um modelo animal está disponível, a informação inicial do efeito protetor pode ser obtido com ensaios de teste de potência com antígenos de patógenos (Pasquale et al. 2015). A evolução toxicológica é normalmente conduzida em espécies de pequenos animais, como camundongos, ratos e coelhos e deve usar a mesma via de administração proposta para uso humano. A dose e a frequência de vacinação pré-clínica deve ser semelhante ou mais elevada do que a dose proposta em humanos para identificar potenciais problemas de segurança. Além disso, estudos pré-clínicos também podem ajudar na escolha da dose ideal de vacina (Mohan et al. 2013).

Caso cheguem a fase de testes clínicos, questões envolvendo potenciais riscos e doses de uma vacina são constantemente avaliados. As preocupações de segurança incluem, mas não estão limitados, a sintomas envolvendo: dor, formação de granulomas, febre, formação de abscessos, náuseas, dor de cabeça, mal-estar e outros eventos locais ou sistêmicos (Mehta et al. 2015). A reatogenicidade observada de formulações pode ser consequência do aumento da resposta imune inata induzida pelo adjuvante no local da inoculação, que é expressa como uma resposta inflamatória local. Em última instância, como os adjuvantes podem atuar diretamente como imunoestimulantes, há uma possibilidade de indução de processos imunitários indesejados, desencadeando o aparecimento de doenças autoimunes. Esse último

parâmetro envolve muita variáveis, tanto genéticas como ambientais, dificultando a condução de pesquisas com resultados conclusivos (Pasquale et al. 2015).

2.4. Adjuvantes a base de carboidratos: xantana e seu potencial

Existem diferentes classes de compostos sendo avaliados como possíveis adjuvantes. Incluem-se nesse grupo: sistemas de entrega como sais minerais, emulsões, micropartículas, moléculas imunoestimulatórias, polímeros naturais e polissacarídeos (Lee & Nguyen 2015). Uma ampla variedade de polissacarídeos foram identificados e testados como adjuvantes vacinais, como as glicanas, frutana, manana e quitina. Alguns destes compostos já foram aplicados com sucesso em ensaios clínicos em humanos. No entanto, alguns obstáculos, incluindo toxicidade/potência, dificuldade de fabricação e baixa estabilidade ainda limitam seu desenvolvimento (Reed et al. 2013).

Os mecanismos moleculares de ativação do sistema imune por adjuvantes à base de carboidratos sugerem que atuam através da ligação a alguns receptores das células do sistema imune inato. Dentre eles, os receptores TLRs, NOD2 e lectinas do tipo C. Além disso, podem ativar diferentes vias, tais como inflamação, sistema complemento e produção de TNF- α e IL-1 via NF- κ B (Petrovsky & Cooper 2011). Também favorecem o aumento da produção de citocinas e moléculas co-estimulatórias, como MHC de classe I e II, CD40, CD80 e CD86 nas APCs, auxiliando resposta específica na apresentação antigênica para linfócitos T e B (Hu et al. 2015). Assim, as estruturas compostas por carboidratos desempenham papéis críticos dentro do sistema imunológico, além da virtude de possuírem um forte histórico de segurança e tolerabilidade devido à fácil biodegradação e biotransformação (Rey-Ladino et al. 2011).

O estudo envolvendo carboidratos está se desenvolvendo rapidamente, com interesse particular na relação entre suas estruturas e função biológica, proporcionando grande potencial para o desenvolvimento de adjuvantes com base em hidratos de carbono (Hu et al. 2015). Esses adjuvantes podem ser bem distintos, apresentando suas próprias características físico-químicas e atributos imunológicos e de comportamento exclusivas. Isso garante uma ampla gama de opções no desenvolvimento de vacinas, com especial interesse nas glicanas. Esse tipo de

polissacarídeo é derivado de plantas ou micro-organismos, constituído de resíduos de D-glicose unidas por ligações glicosídicas, com várias conformações alternativas, sendo subdivididas entre dois tipos: α -glicanas (ex. dextrana, glicogênio e amido) e as β -glicanas (ex. celulose, lentinano, zimosana e xantana). O método de produção pode resultar em diferentes estruturas de polímeros com ramificações e tamanhos de cadeias diversos, apresentando variedades únicas entre eles (PETROVSKY, 2011).

A goma xantana é um polissacarídeo complexo extracelular produzido por bactérias gram-negativas do gênero *Xanthomonas*. Esse polissacarídeo auxilia sua sobrevivência no ambiente sobre a superfície da planta hospedeira, promovendo resistência a temperaturas e radiação ultravioleta elevadas. Porém, a xantana vêm sendo amplamente utilizada comercialmente como um espessante ou agente de viscosidade em indústrias alimentícias e não alimentícias, devido a sua capacidade de formar soluções viscosas e géis hidrossolúveis com propriedades únicas (García-Ochoa et al. 2000).

Esse polissacarídeo consiste em uma cadeia principal celulósica composta por resíduos de β -D-glicose. Na posição C(3) de cada resíduo alternado de glicose existe uma cadeia lateral trissacarídica contendo unidades de duas β -D-manose intercaladas com um resíduo de ácido D-glicurônico. As unidades de D-manose podem ainda serem acetiladas e podem apresentar resíduos de ácido pirúvico ligados na posição 4 e 6 na D-manose terminal (Figura 3). Esses substituintes aniônicos influenciam tanto as propriedades físicas quanto químicas da xantana (Erten et al. 2014).

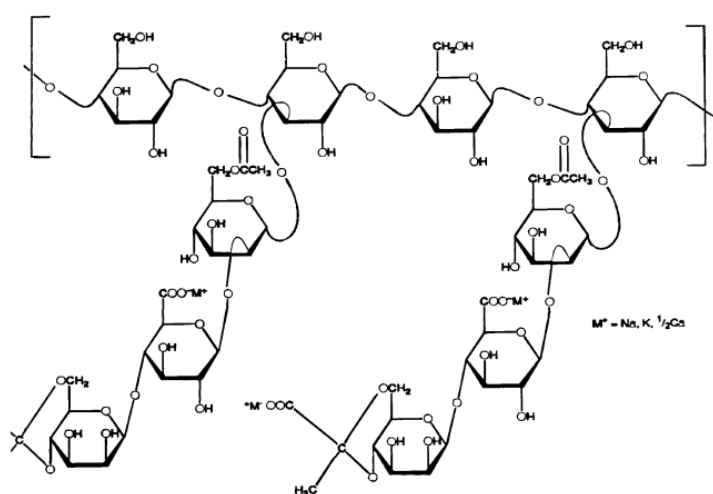


Figura 3: Estrutura do polissacarídeo extracelular de *Xanthomonas* (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

Os trabalhos envolvendo a atividade imunoestimulante da xantana estão sumarizados na tabela 3, totalizando 5 trabalhos até o presente momento. As propriedades adjuvantes intrínsecas da goma xantana como ativador de linfócitos murinos foram originalmente descritas na década de 80. Utilizando linfócitos B isolados de a partir do baço de camundongos (linhagem C3H/HeJ), Ishizaka e colaboradores demonstraram a capacidade em induzir respostas policlonais na ausência de células T. De forma semelhante ao LPS, a xantana foi capaz de induzir a produção de anticorpos policlonais IgM e IgG, sendo a produção máxima quando 500 ou 1.000 µg/mL foram adicionados as culturas de células (Ishizaka et al. 1983).

Somente em 2009, a xantana foi alvo de novos estudos relativos a suas propriedades adjuvantes. Takeuchi e colaboradores investigaram a produção de mediadores inflamatórios em linhagem celulares de macrófagos (J772, RAW264.7), sendo capaz de promover a produção de TNF- α e IL-12. Em adição, utilizando camundongos C3H/HeN (MyD88-TLR2 deficientes) e C3H/HeJ (TLR4 deficiente) mostraram que a xantana é capaz de ativar as células via TLR4 através da cultura de células peritoneais aderentes desses animais. Além disso, a administração oral com xantana promoveu uma atividade antitumoral em camundongos C57BL/6 inoculados subcutaneamente contra células tumorais B16K^b, atuando de forma profilática na redução do crescimento tumoral, na sobrevivência dos animais e aumento da atividade e linfócitos NK e T CD8⁺ (Takeuchi et al. 2009).

Chiou e colaboradores investigaram a adjuvancidade da xantana em formulações de lipossomos bioadesivos combinados com o vírus H5N3 inativado como antígeno modelo em aves (White Leghorn). A imunização com xantana (0,2% e 0,3%) via intranasal no regime de duas doses promoveu uma aumento significativo nos níveis de IgA e IgG avaliados através do ensaio de ELISA (Chiou et al. 2009). De forma semelhante, Bertram e colaboradores avaliaram a atividade adjuvante da xantana (0,5%) por via intranasal combinada com o vírus H1N1, mostrando o aumento dos níveis séricos após duas doses de IgG em ratos Sprague-Dawley e IgG e IgA em camundongos OF1 (Bertram et al. 2010).

Em 2014, Bacelo e colaboradores avaliaram a xantana como adjuvante vacinal combinado com o antígeno produzido de forma recombinante LigANI, uma lipoproteína de membrana externa de *Leptospira interrogans*. Após o regime de imunização subcutânea de duas doses, a xantana (0,5%) foi capaz de estimular uma alta resposta humoral de IgG em hamster golden Syrian. Além disso, os animais

imunizados com a xantana apresentaram alta taxa de sobrevivência (100%) após o teste desafio contra a cepa patogênica de *L. interrogans* serovar Copenhageni (Bacelo et al. 2014).

Porém, apesar de ter demonstrado propriedades adjuvantes nesses trabalhos, ainda não foi descrito como ocorre a imunomodulação *in vivo* por esse polissacarídeo.

Tabela 3: Capacidade adjuvante da xantana.

Avaliação	Descrição	Referência
<i>In vitro</i>	Estímulo de produção de anticorpos IgM e IgG por linfócitos B Ativação de linfócitos B imaturos	(Ishizaka et al. 1983)
<i>In vivo/in vitro</i>	Indução de IL-12 e TNF- α em cultura <i>in vitro</i> de macrófagos Ativação de TLR4 via MyD88 Efeito <i>in vivo</i> antitumoral em camundongos contra linhagem B16K ^b de melanoma Aumento da atividade de células NK e linfócitos T CD8 ⁺	(Takeuchi et al. 2009)
<i>In vivo</i>	Indução de IgA e IgG por via intranasal em vacinas bioadesivas combinadas com vacinas contra influenza (H5N3) em aves	(Chiou et al. 2009)
<i>In vivo</i>	Indução anticorpos por via intranasal em vacinas bioadesivas combinadas com vacinas contra influenza (H1N1) em ratos (IgG) e camundongos (IgG e IgA)	(Bertram et al. 2010)
<i>In vivo</i>	Estímulo de produção de anticorpos IgG por linfócitos B Aumento da proteção contra leptospirose combinada com antígeno recombinante	(Bacelo et al. 2014)

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1. Hipótese

O polissacarídeo xantana pode atuar como adjuvante vacinal, aumentando a resposta imunológica de antígeno modelo em camundongos.

3.2. Objetivo Geral

Avaliar a capacidade imunoestimulatória do polissacarídeo xantana produzido por *Xanthomonas arboricola* pv. pruni 106 como adjuvante vacinal em camundongos imunizados com ovalbumina como antígeno proteico modelo.

3.3. Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial citotóxico da xantana utilizando cultura de células mamíferas NIH/3T3 de fibroblastos de camundongo *in vivo*;
- Imunizar camundongos, por via subcutânea, utilizando ovalbumina como antígeno proteico modelo e o polissacarídeo xantana como adjuvante;
- Determinar o perfil de resposta imune humoral modulado por xantana, através de ensaio de detecção dos níveis das diferentes subclasses de IgG;
- Avaliar a capacidade de linfoproliferação a partir dos esplenócitos obtidos dos animais imunizados, bem como produção de INF- γ .

4. CAPÍTULOS

4.1 Artigo – The Use of Xanthan Gum as Vaccine Adjuvant: An Evaluation of Immunostimulatory Potential in BALB/c Mice and Cytotoxicity in vitro

Artigo submetido à revista *Biomed Research International*

Short Title: Immunostimulatory Response of Xanthan Gum

Rodrigo Andrade Schuch¹, Thaís Larré Oliveira¹, Thaís Farias Collares¹, Leonardo Garcia Monte¹, Guilherme Roig Inda¹, Odir Antonio Dellagostin¹, Claire Tondo Vendruscolo¹, Angelita da Silveira Moreira^{1,2}, Daiane Drawanz Hartwig^{1,3*}

Affiliations:

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

² Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

³ Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

***Corresponding Author:**

Daiane Drawanz Hartwig

Email: daianehartwig@gmail.com (DDH)

Abstract

The successful production of new, safe and effective vaccines that generate immunological memory is directly related to adjuvant feature, which is responsible for increasing and/or modulating the immune response. Several compounds display adjuvant activity, including carbohydrates. These compounds play important roles in the immune response, as well as having biocompatible properties in vaccine formulations. One such carbohydrate is xanthan gum, a polysaccharide that is produced by the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas* spp, which has adjuvant attributes. This study evaluated the immune response induced by xanthan gum associated with ovalbumin in BALB/c mice, that were subcutaneously immunized, in terms of antibody production (IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3) and assessed the levels of INF- γ in the splenocyte culture using indirect ELISA. Furthermore, we investigated *in vitro* cytotoxicity of xanthan in the embryo fibroblasts cell line of the NIH/3T3 mouse by MTT assay and propidium iodide uptake assay. The mice immunized with ovalbumin plus xanthan gum exhibited higher antibody IgG1 responses than control groups. Furthermore, the xanthan polysaccharide was capable of increasing the immunogenicity of antigens by producing INF- γ and did not exhibit cytotoxicity effects in NIH/3T3 mouse fibroblast cells, considered a promising candidate for vaccine adjuvant.

Keywords: *Xanthomonas*; adjuvant; ovalbumin; immune response

Introduction

Vaccine adjuvants are compounds used to improve the immunogenicity of a particular antigen¹. Aluminum-based mineral salts, approved for human use by the US Food and Drug Administration (FDA), are the most widely used vaccine adjuvants since 1920, inducing predominantly antibody responses. As such, the discovery of new adjuvants is crucial for the development of vaccines that require a cell-mediated response^{2,3}. Modern adjuvant development is based on enhancing and shaping vaccine-induced responses without compromising safety by selectively adding well-defined molecules, formulations, or both⁴. New adjuvant formulations are in advanced stages of development and licensing. Different compounds have demonstrated adjuvant ability, including bacterial products, emulsions, nucleic acids and microparticles. However, pre-clinical trials show the lack of basic safety requirements for humans use⁵⁻⁹.

Numerous polysaccharides originated from plant and microbes have been tested for their potential applications as adjuvants in vaccinations¹⁰. Each of these carbohydrate-based vaccine adjuvants can be very different from one another and can offer their own physical and chemical characteristics, immunological behavior and unique attributes. As such, there is a wide range of options available for their use in vaccine development. Furthermore, many of these options have an established history of safety and tolerability due to easy biodegradation and biotransformation¹¹.

Xanthan gum is a complex extracellular polysaccharide that is produced by the plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas* spp., which has viscous properties. Commercial xanthan is widely used as a thickener or viscosifier and a stabilizer in the food and pharmaceutical industry¹². This polysaccharide consists of a cellulose-based main chain linked to a trisaccharide side chain composite of two D-mannose units with alternating D-glucuronic acid residues. The D-

mannose units can be differently acetylated, approximately half the outer D-mannose contain pyruvic acid residues; these anionic substituents influences both the chemical and physical properties of xanthan¹³. The first reports of the intrinsic adjuvant properties of xanthan gum originally emerged in the 1980s¹⁴. More recently, xanthan has been successfully used in bioadhesive formulations for intranasal influenza virus immunizations^{15,16}, and it has been proven capable of enhancing the immunogenicity of recombinant antigens and generating protection against the pathogenic strains of *Leptospira interrogans*¹⁷.

However, the immune response generated by this polysaccharide when employed as vaccine adjuvant has not previously been studied. In the present study, we characterize the immune response elicited by polysaccharide xanthan using a well-characterized model antigen, ovalbumin (OVA), which is a immunogenic antigen that has often been used as a proof of principle for numerous vaccination strategies^{18,19}.

Methods

Animals

Female BALB/c mice (from Central Animal Facility, Federal University of Pelotas, Brazil), aged between five and six weeks were used in this study. The animals were acclimated for one week before use. Feed and water were offered *ad libitum*, and the mice were kept in photoperiod for 12/12 hours at 24 °C temperature and 50% humidity. All experiments were conducted in accordance with the regulations, policies, and principles of the National Council for Animal Experiments Control in Brazil (CONCEA) and the manual established by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Federal University of Pelotas (UFPel), approved under protocol number 3418.

Producing the Xanthan Polysaccharide

The *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strain 106 was used to produce the xanthan gum in a 10 l bioreactor (BioStat B. Braun Biotech International) as previously described²⁰ and controlling the pH to either pH 7. Briefly, the fermented broth was heated at 121 °C for 15 min, and the xanthan gum was obtained by precipitation with ethanol [96%, 4:1 ratio (v/v)]. The polysaccharide was dried to a constant weight at 56 °C and then milled to particle size using a 60-150 mesh. The milled polymer was diluted with ultrapure water (1.25%, w/v) under stirring to provide uniform viscous solution, sterilized and then stored at 4 °C. It was chemically and physically characterized according to viscosity, moisture, ash nitrogen, acetyl, pyruvate content, and the monosaccharaides and derivative acids presents as previously determined^{17,21}.

Presence of LPS in the Xanthan

A colorimetric method Limulus Amebocyte Lysate (Pierce, Thermo Scientific) was used according to the manufacturer's instructions to detect the LPS in the aqueous xanthan gum produced. Briefly, 50 µl a standard curve and sample containing different concentrations of aqueous xanthan [0.1-0.5 % (w/v)] were dispensed in equilibrate microplates at 37 °C in triplicate for 5 min. Then, 50 µl of LAL reagent was added to each well, shaken for 10 seconds and incubated at 37 °C for 10 minutes. For reaction development, 100 µl of substrate solution was added to each well, shaken for 10 s, and then incubated at 37 °C for 6 min. The reaction was terminated by the addition of 50 µl of acetic acid 25% [25% (v/v)] and the absorbance measure at 405 nm on a plate reader.

537 ***In Vitro* Evaluation Cytotoxicity of Xanthan**

538 The effect of the polysaccharide on the viability of the NIH/3T3 mouse fibroblasts cell line was
 539 assessed by a colorimetric technique through which the reduction of soluble MTT [3-(4,5-
 540 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] was measured. Cells were seeded at
 541 density of 1×10^4 cells per well in a volume of 100 μ l in 96-well plates and incubated with
 542 different concentrations of an aqueous solution containing the polysaccharide (0.1, 0.25, 0.5
 543 0.75 and 1%), Alhydrogel or DMSO [1% (v/v)] for 24 and 48 h. The media was removed and
 544 90 μ l of medium and 10 μ l of MTT (5 mg/ml solution, Sigma) were added to each well. The
 545 plates were then incubated for an additional 3 h, and the medium was discarded. The formazan
 546 crystals were dissolved by adding 100 μ l of DMSO to each well and shaking for 10 min at 200
 547 $\times$ g. The absorbance of each well was read on a microplate reader at 560 nm. The cell inhibitory
 548 growth rate (%) was determined as follows: inhibitory rate = $(1 - \text{Abs}_{560 \text{ Treated cells}} / \text{Abs}_{560 \text{ control}}$
 549 $\text{cells}) \times 100\%$. The data was validated by three independent experiments performed in triplicate.

550 A propidium iodide (PI) assay was also performed to analyze cellular damage. Briefly, NIH/3T3
 551 cells were seeded at a density of 1×10^4 cells per well in a 24-well plate followed by treatments:
 552 xanthan (0.5% w/v), DMSO (1% v/v), Alhydrogel or medium for 48 h. Following treatment, PI
 553 was added (7.5 μ M) to each well and left for 15 min and observed by fluorescence microscope
 554 using a red excitation wavelength (543 nm) and emission wavelength 615 nm filter under 40 $\times$
 555 magnification using fluorescence microscopy (OLYMPUS IX-512, Japan).

556 **Mice Immunization Procedures**

557 Four groups containing seven BALB/c mice were immunized subcutaneously with 10 μ g of
 558 OVA (Invivogen, USA) in combination with 15% (v/v) Alhydrogel [2 % Al(OH)₃, Invivogen,
 559 USA], 0.5% (v/v) xanthan polysaccharide or 0.9% (v/v) endotoxin-free sterile saline (<0.1

EU/mL, Invivogen, USA). Mice inoculated with a 0.9% (v/v) saline solution were included as a negative control group. The immunizations were performed twice at 14-day intervals, and the animals were euthanized 14 days after the second immunization. The immunization regimen is described in Fig 1. Three independent experiments were conducted. Blood samples were collected from the retro-orbital venous plexus after administration of anesthetic eye drops before each immunization and centrifuged at $5,000 \times g$ for 10 min. The serum samples were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Isotyping of Anti-OVA Antibody Using ELISA

The levels of anti-OVA IgG subclasses in the serum of the mice were determined by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The 96-well plates with round bottom wells were coated with OVA diluted in carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6, at a concentration of 100 ng per well for 16 h at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The ELISA plates were washed three times with PBS-T [PBS with 0.05% (v/v) Tween 20] followed by blocking with 200 μl of PBS-FBS [PBS with 5% (v/v) fetal bovine serum] at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 h. Following three washes with PBS-T, mice serum samples or 0.5% PBS-FBS were added to wells at 1:100 in triplicate followed by incubation for 1 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ before the plates were washed three times with PBS-T. A goat anti-mouse primary antibody isotype IgG1, IgG2a, IgG2b or IgG3 (Sigma, USA) was added at 1:1,000 for 1 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, followed by three washes with PBS-T to remove unbound antibodies. For reaction development, peroxidase-conjugated antibody rabbit anti-goat IgG (Sigma, USA) was added at 1:5,000 for 1 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ and washed five times with PBS-T before the liquid substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) was added for 15 min at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. The reaction was stopped by adding 2N H_2SO_4 / well. The optical density was measured using a microplate reader at 492 nm.

584 ***In Vitro* Lymphocyte Proliferation Assay**

585 BALB/c mice were euthanized at the end of the immunization protocol, and their spleens were
586 aseptically removed and macerated with a syringe plunger against a fine steel mesh. The
587 erythrocytes were lysed with ammonium chloride [0.9%, (w/v)] and then centrifuged at $300 \times$
588 g, 4° C for 10 min. Splenocytes were washed in Hank's Solution and then suspended in DMEM
589 (2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 50 µg/ml gentamicin)
590 with 10% FBS. The cells were counted after staining with 0.4% trypan blue for viability.
591 Splenocytes were plated at 5×10^5 cells per well in triplicate onto 96-well tissue culture plates
592 (TPP; Sigma). Spleen cells were stimulated with 10 µg/ml of concanavalin A (ConA, positive
593 control); 10 µg/ml of OVA; or medium alone (negative control). Cells were cultured for 48 h
594 at 37 °C in 5% CO₂, and proliferative rates were determined by SRB colorimetric assay. The
595 medium was removed immediately after 48 h, and 100 µl 10% precooled trichloroacetic acid
596 (TCA) was added per well at 4 °C as a fixative. Fixed cells were left on the plate at 4 °C for 1
597 h; then plates were washed five times with distilled water and dried. Cells were stained with 4
598 mg/ml SRB solution [Sulforhodamine B 0.4% (w/v) in 1% acetic acid]; 100 µl was added to
599 each well for 30 min at room temperature, and then the plates were washed five times with a
600 1% acetic acid solution and dried. The stain was dissolved using 100 µl of 10 mM Tris buffer
601 pH 10.5 and plates were read at 560 nm using UV-visible spectrophotometer. The stimulation
602 index (SI) was calculated follow: the ratio between the OD (mean) of the cells cultured with
603 the antigen and the OD (mean) of the cells cultured in medium alone in the respective
604 immunized group.

605

606 **INF- γ in Supernatants of Splenocyte Cultures**

607 Splenocytes were isolated from the immunized mice using the process previously described.
608 The suspensions cells were plated in 24-well tissue culture plates (TPP; Sigma), containing
609 2×10^6 cells /well. The samples were incubated with OVA (10 μ g/ml), ConA (10 μ g/ml) or
610 medium, at 37 °C in 5% CO₂. After 48 hours, cell-free culture supernatants were collected and
611 stored at -70 °C. Levels of IFN- γ were measured by ELISA (BD Bioscience, USA). The capture
612 antibody was added and the plates were incubated for 16-18 h at 4°C. The ELISA plates were
613 washed five times with PBS-T, followed by incubation with blocking buffer [PBS with 10%
614 (v/v) fetal bovine serum] for 2 h at room temperature. A standard concentration curve were
615 created by cytokine dilution (0 to 2,000 pg). Then, 100 μ l of each supernatant sample or standard
616 were added and incubated for at least 2 h at room temperature. Subsequently, after five washes
617 with PBS-T, antibody detection solution was added at 1:2,000 for 2 h and, following five washes
618 with PBS-T, a working substrate was added to each well. Incubation then proceeded at room
619 temperature for reaction development. The optical density was measured using a microplate
620 reader (405 nm with correction set at 650 nm) in an ELISA plate reader (results expressed in
621 pg/ml).

622 **Statistical Analysis**

623 Data were expressed as mean $\pm$ SD and significant differences between groups were determined
624 using analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-test via the Prism6 software (GraphPad
625 Software Inc., La Jolla, CA, USA). *P* values <0.05 were considered to be statistically
626 significant.

627

Results

Chemical Characterization and Quantification of LPS in the Xanthan Gum

The chemical characterization of xanthan has been previously described¹⁷. The xanthan gum used in this experiment had moisture, ash, nitrogen, acetyl, pyruvate, and good viscosity in accordance with the recommendations by the FAO and Burlock for xanthan used as food additives^{22,23}. We also investigated the presence of LPS in various concentrations of xanthan gum by LAL endotoxin test. All concentrations tested exhibited low amounts of endotoxins (<0.2 EU/ml) (data not show).

Cytotoxicity of Xanthan Gum

The anti-proliferative activity of xanthan was studied in NIH/3T3 mouse fibroblasts cell line. The cell viability was determined by MTT assay after 24 and 48 h of incubation with different concentrations of xanthan (Fig 2A). Cells incubated with medium only were taken as negative control, while those incubated with DMSO (1.0%) were the positive control. None of the aqueous xanthan solutions (0.1-1.0%) were cytotoxic *in vitro*. No statistically significant differences in the growth rate (<50%) were observed between the different xanthan concentrations and the negative controls over the 24 or 48 h period ($P>0.05$). In contrast, Alhydrogel exhibited growth inhibition rates above 50%, demonstrating cytotoxic effect in fibroblasts cells.

The effects of the adjuvant formulations were also tested to assess the change in cell morphology after 48 h (Fig 2B). Red-fluorescent propidium iodide is a cell impairment DNA-binding dye

that indicates an increase in plasma membrane permeability and loss of plasma membrane integrity. Both the cells treated with xanthan and the untreated cells exhibited low red fluorescence (Fig. 2B, a and b), which denoted regular and intact cells. This was confirmed by phase contrast image. A change in the morphology of the cells treated with xanthan was also identified when compared to the non-treated cells. Observation of the cells treated with Alhydrogel 15% (Fig. 2B, c) identified damaged cellular membrane with uptake by PI, with morphological alterations when compared to the untreated control. These cells also exhibited typical features of apoptosis such as apoptotic nuclei with highly condensed or fragmented chromatin in multiple sites.

Humoral Immune Response in Immunized Mice

In order to assess the specific antibody response in groups of mice immunized with OVA, blood samples were collected on days 0, 14 and 28, and the levels of the subclasses of IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3) present in the serum were determined by ELISA (Fig. 3). The group OVA-xanthan was able to induce humoral response mediated by IgG1 after the second immunization (day 28), and this was higher than the ovalbumin-saline group ($P < 0.05$). IgG1 antibody levels were also detected after the first immunization (day 14) and second immunization (day 28) for the OVA-Alhydrogel group. For the other IgG subclasses, only the OVA-Alhydrogel group had detectable humoral immune response ($P < 0.05$) after the second immunization. The other groups exhibited no statistically significant levels of antibodies to IgG2a, IgG2b or IgG3.

Splenocyte Proliferation Evaluated by SRB

The effects of xanthan on splenocyte proliferative responses to ConA and OVA stimulation was evaluated by SRB assay (Fig. 4). Splenocyte obtained from group OVA-xanthan (stimulation index =1.78) and OVA-Alhydrogel (SI=2.42) stimulated *ex vivo* with OVA proliferated at higher levels than those in the OVA-salin group (Fig. 4). The saline group (negative control) did not stimulate splenocyte, thus demonstrating that the CD4 T-cell lymphoproliferation was a specific response to OVA. The addition of OVA to lymphocytes from animals that had not been primed with the antigen produced non-significant levels of proliferation. Cells were treated with ConA, which was employed as a positive control for the experiment.

Production of INF- γ by Splenocyte Culture

The presence of the cytokine INF- γ were analyzed in supernatants of cultured spleen cells from immunized mice to evaluate cellular response in polarization of immune response (8). OVA-xanthan immunized mice had higher levels of IFN- γ following *ex vivo* stimulation with OVA than the other groups (Fig. 5). The levels of INF- γ were similar to those for the ConA positive control (not shown). In contrast, no INF- γ production was detected when spleen cells from other groups under the same experimental conditions were compared. Measurements of spleen cells from negative control animals stimulated with OVA produced negligible results. These data indicated that the CD4⁺ T-cell responses following immunization with OVA-xanthan were biased toward Th1.

693 Discussion

694 Most licensed vaccines for use in humans work through protective antibody responses mediated
695 by B-cells. This fact have limited the success of vaccines against pathogens whose response is
696 T-cell dependent. Thus, there is a need for new adjuvants that deliver antigens in a manner as
697 to induce an appropriate T-cell-mediated response^{9,24}. In addition, an appropriate polarization
698 of the immune response is associated not only with the delivery system, but also with the nature
699 of the antigen and characteristics of the route and frequency of administration²⁵. The correct
700 adjuvant in combination with the antigen should be capable of inducing both humoral and
701 cellular immune responses in vaccines¹. Xanthan gum, a widely used suspending and
702 thickening agent, has a backbone chain that consists of (1,4) β -D-glucan cellulose and is a
703 negatively charged polymer with intrinsic adjuvanticity that is able to activate polyclonal
704 lymphocytes B in the absence of T cells¹⁴. However, the biological properties and the
705 mechanism of xanthan adjuvanticity are not clear and, until recently, they have remained
706 unexplored.

707 A low incidence of adverse events is critical for the advancement of vaccine candidates. The
708 biosafety of xanthan gum is evident in the fact it has been used as an FDA-approved food
709 additive and rheology modifier since 1969^{10,11}. The parameters evaluated on the constitution of
710 the xanthan produced in this study were within the required standards established by the FAO²².
711 However, parameters for xanthan composition as a vaccine adjuvant have yet to be established.
712 To further confirm that the immune response induction by xanthan gum was not mediated by
713 contaminating the LPS, we measured endotoxin contamination in samples of different
714 concentrations of xanthan gum. All concentrations tested contained low amounts of LPS (<0.2
715 EU/ml) (data not shown), indicating that the antigenicity of xanthan is unlikely to be related to
716 the LPS present in the polysaccharide preparation.

Our study showed that xanthan gum produced from *Xanthomonas arboricola* pv pruni 106 did not affect NIH/3T3 cell viability. All concentrations tested, including the highest, also had no effect on cell viability, highlight the biocompatibility of the tested polysaccharide. Furthermore, previous studies have demonstrated that xanthan gum preparations have a record of safety *in vitro*^{15,26}, and in preclinical trials²⁷, confirming the data obtained in this study. In addition, xanthan is regularly consumed by humans without ill effect. Although further testing is required, these findings are encouraging for the clinical development of xanthan as adjuvant vaccine platform.

Most licensed adjuvants work by promoting protective antibody responses. The most abundant immunoglobulin in serum is IgG, which have four subtypes in mice (IgG1, 2a, b and 3). Each of these subtypes has a specific function and affinity to FcγR receptors on innate immunity cells²⁸. Further to their well-defined roles in triggering the activation of innate effector cells, these receptors are important in antigen presentation and maturation mediated by immune complexes on dendritic cells as well as the adjustment and maintenance of B cell survival²⁹. In present study, an antibody response were observed following vaccination with OVA-xanthan. Detectable levels occurred following the administration of the priming dose, and the titers increased with each subsequent boost. Previous work has demonstrated that xanthan gum is able to induce class IgA and IgG antibodies when administrated via mucosal¹⁶. Data published by our group showed that xanthan gum is able to induce high titers of IgG antibodies when administered subcutaneously with antigen LigANI from *Leptospira interrogans*¹⁷. This difference may be related to the different antigens and the different animal models studied. In addition, whereas mice that received OVA in Alhydrogel mounted a strong IgG response, mice vaccinated with OVA-xanthan exhibited only IgG1 response. This can be attributed to the mechanism of action of aluminum salts through Th2 immune response, which induced the B-cell's production of antibodies, confirming the data obtained during this experiment³⁰.

On the other hand, splenocyte proliferation is a crucial event in the activation cascade of both cellular and humoral immune responses^{31,32}. As such, the mitogen effects of OVA on the proliferations of splenocytes were investigated within this study. We demonstrated that splenocytes isolated from animals immunized with OVA plus xanthan are capable of responding to antigens by promoting the proliferation of lymphocytes. OVA would be expected to be preferentially presented by the MHC-II pathway rather than cross-presented by the MHC-I pathway³³⁻³⁶, which indicates a T CD4+ response in cellular culture.

In addition to B-cell humoral response, we found that xanthan gum increases the immunogenicity of model antigen through cellular responses to INF- γ . This aspect of immune responses is crucial factor in the development of new vaccine adjuvants⁸. A previous study found that xanthan gum was capable of enhance antitumoral activity in mice by toll-like receptor (TLR)-4 recognition, which induces the production of inflammatory cytokines, including TNF- α and IL-12 p40, via nuclear factor- κ B (NF κ B)³⁷. In addition, most of the similar carbohydrate-based adjuvants, such as lentinan, zimosana, manana and muramyl dipeptide (MDP), that act by binding to the innate immune response receptors that recognize Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), including TLRs, NOD2 and C-type lectins, result in pro-inflammatory cytokine production^{10,24,38}. Furthermore, β -1,3-D-glucan polymers purified from *Saccharomyces cerevisiae* have demonstrated the ability to induce IgG1 and IgG2c antibodies and T-cell responses Th1 to INF- γ in mice²⁴. In combination with pro-inflammatory cytokines, TLR-induced signal(s) is/are required for memory CD4+ T cell differentiation (but not for the activation of memory T cells), inducing dendritic cells maturation and migration to the lymph nodes, as well Th1 induction^{39,40}. Thus, the xanthan gum has immunostimulatory capabilities that make it a great adjuvant for future vaccine formulations.

Conclusion

In the present study, we demonstrated the adjuvant effect of xanthan gum when used with OVA. Summarily, it was able to stimulate cellular immune response by cytokine INF- γ and humoral response via IgG1. Furthermore, the xanthan polysaccharide was considered to be biocompatible when tested *in vitro*. These results show the use of xanthan gum as a promising vaccine adjuvant.

Acknowledgments

We are grateful to Michele dos Santos for the technical assistance provided during this study. This work was supported by CAPES, CNPq, and FAPERGS Brazilian funding agencies.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

Figure legends

Fig 1: Schematic representation of vaccination regimen. Seven mice BALB/c per group receive subcutaneous immunizations with different treatments at intervals of 14 days, followed by splenocytes culture and measurement of INF- γ in culture supernatants and proliferative activity in response to OVA.

Fig 2. *In vitro* cytotoxicity of the aqueous xanthan solution. (A) The effect of different concentrations of aqueous xanthan solutions on the inhibition of NIH/3T3 cells was determined using an MTT assay. The inhibition rate was related to the negative control (DMEM). Cells were treated with DMSO 1% as positive control. The data are expressed as the means $\pm$ SD of three independent experiments. (B) Representative composite images show cell viability by propidium iodide (PI) staining after the cells were treated with xanthan 0.5% (b) or Alhydrogel 15% (c) for 48 hours, stained with PI and visualized by fluorescent and phase-contrast microscopy. Untreated cells (a) and those treated with DMSO 1% (d) as controls of experiments. Red fluorescence indicates membrane damage and PI uptake. Arrows represent dead cells with apoptotic nuclei. Original magnification $\times$ 40.

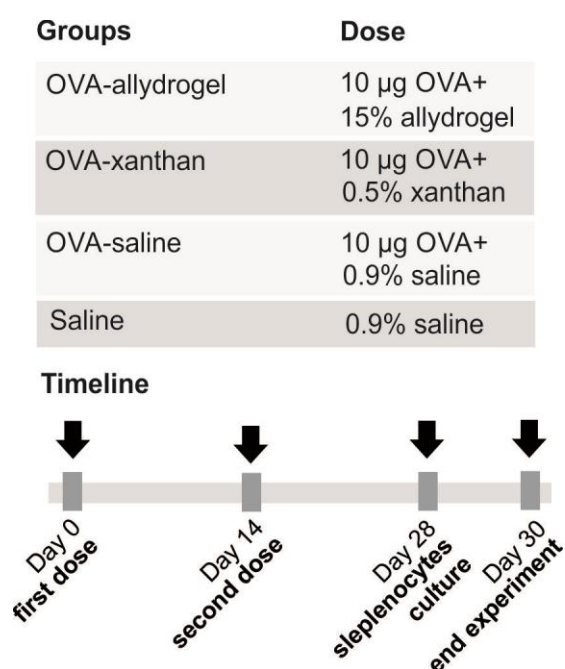
Fig 3. IgG Isotypes antibodies induced by xanthan gum. BALB/c mice were subcutaneously immunized twice at a two-week interval with OVA (10 μ g) alone as a control, or in combination with Alhydrogel (15%), or xanthan (0.5%). A group immunized with saline solution was used as control. Blood was collected on days 0, 14 and 28 after immunization. The responses of the IgG isotypes (IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3) were determined by ELISA with serum dilution 1:100, and humoral response compared to the negative control group (saline). The values shown are the mean $\pm$ SD of three independent experiments. (* P <0.05, ** P <0.005).

Fig 4. Splenocytes proliferative responses. Splenocytes were prepared two weeks after the last immunization and cultured for 48h with ConA (final concentration 10 µg/ml) or OVA (final concentration 10 µg/ml). The proliferation of splenocytes was measured using the SRB method as described, and shown as a stimulation index (SI). The values represent mean ± SD of three independent experiments (n=7 per group). Bars with different letters represent $P<0.05$.

Fig 5. Quantification of INF-γ in splenocytes culture by ELISA. Spleen cells were isolated and cultured in 24-well tissue culture plates (5×10^6 cells/well) for 48h. The levels of the IFN-γ in cell-free culture supernatants were measured by ELISA. The values represent the mean ± SD of the three independent experiments. For statistical analysis, concentration values for the immunized groups treated with the OVA were compared with those for the OVA-saline immunized group treated with OVA, and bars with different letters represent $P<0.05$.

Figures

Fig 1.



816 Fig 2.

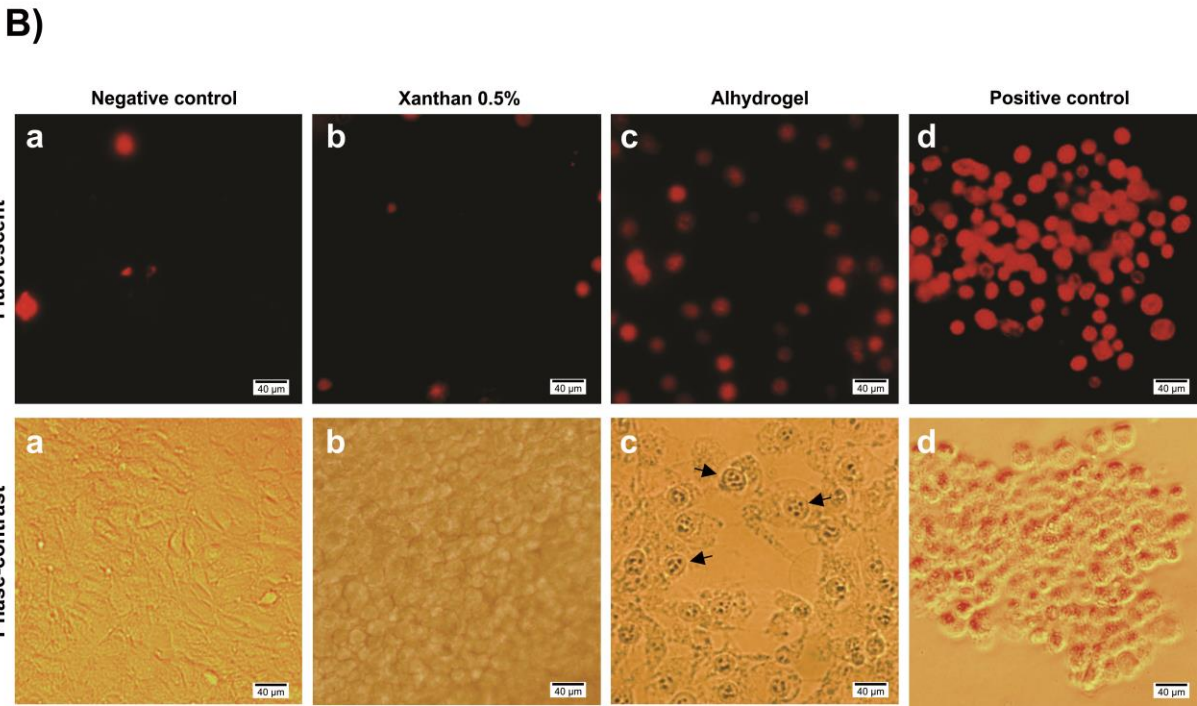
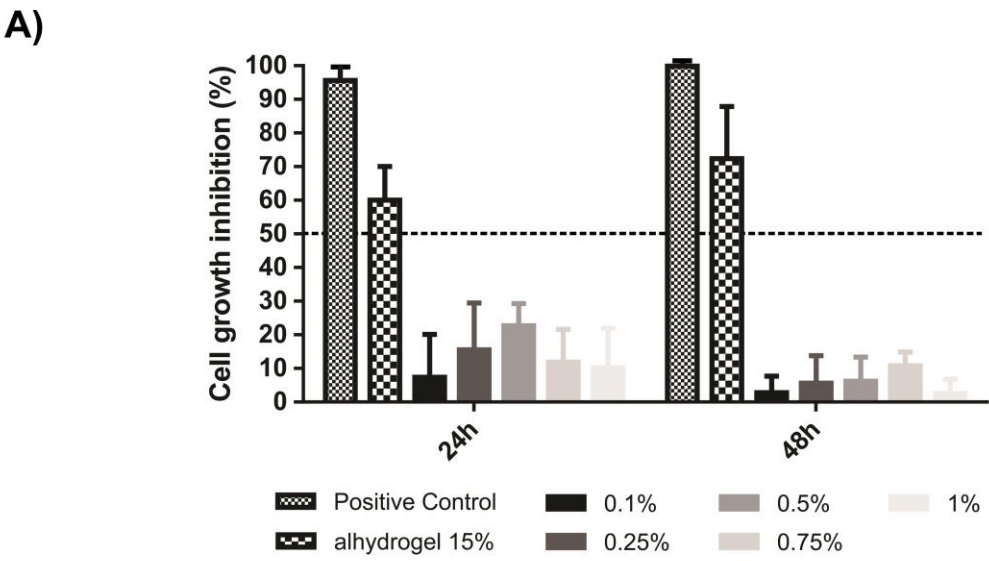


Fig 3.

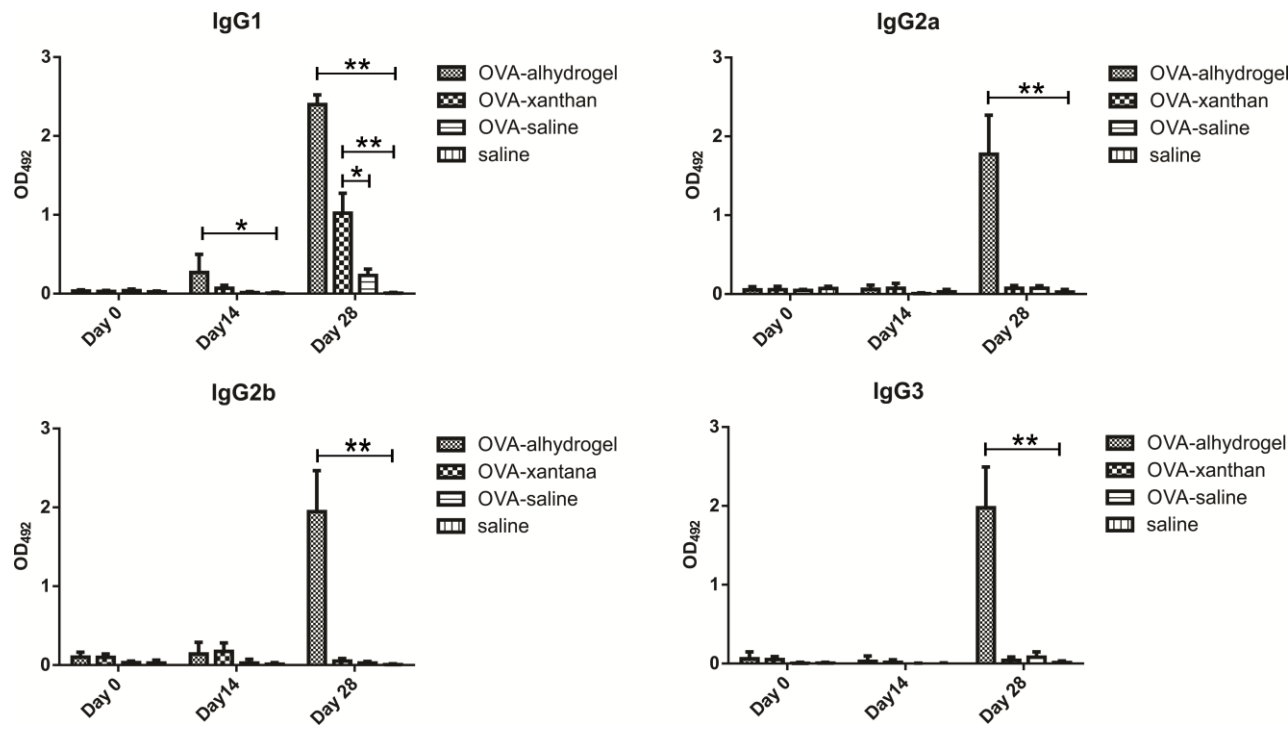
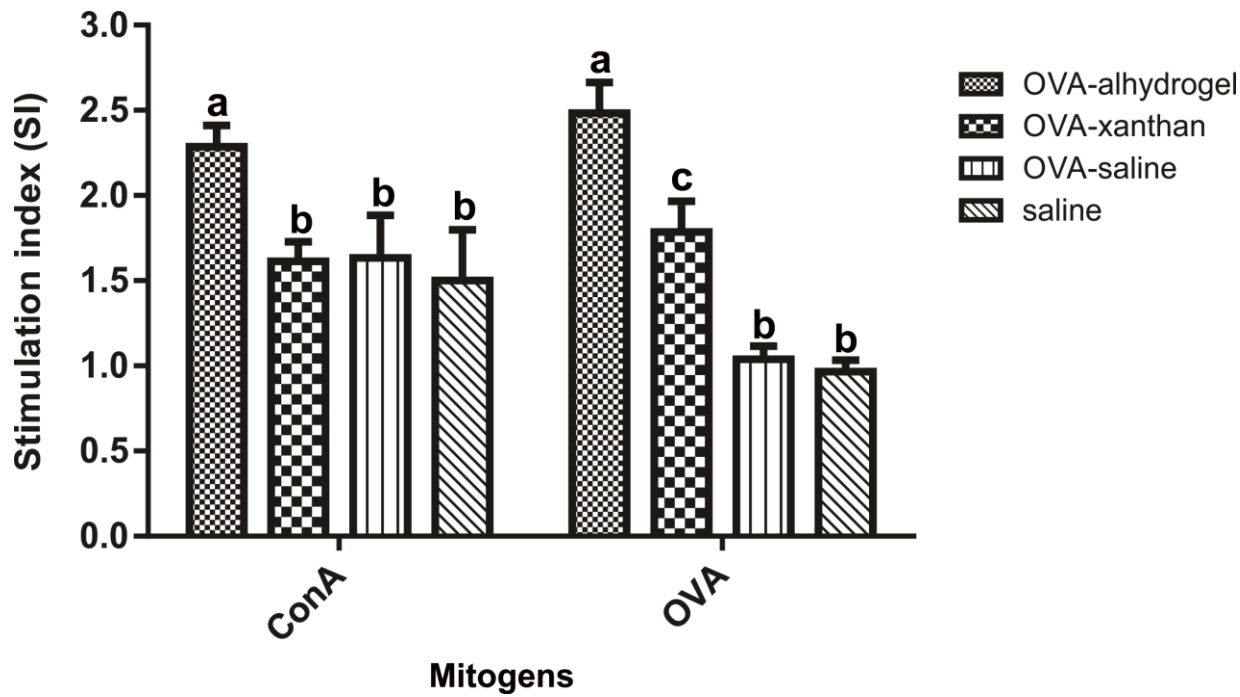
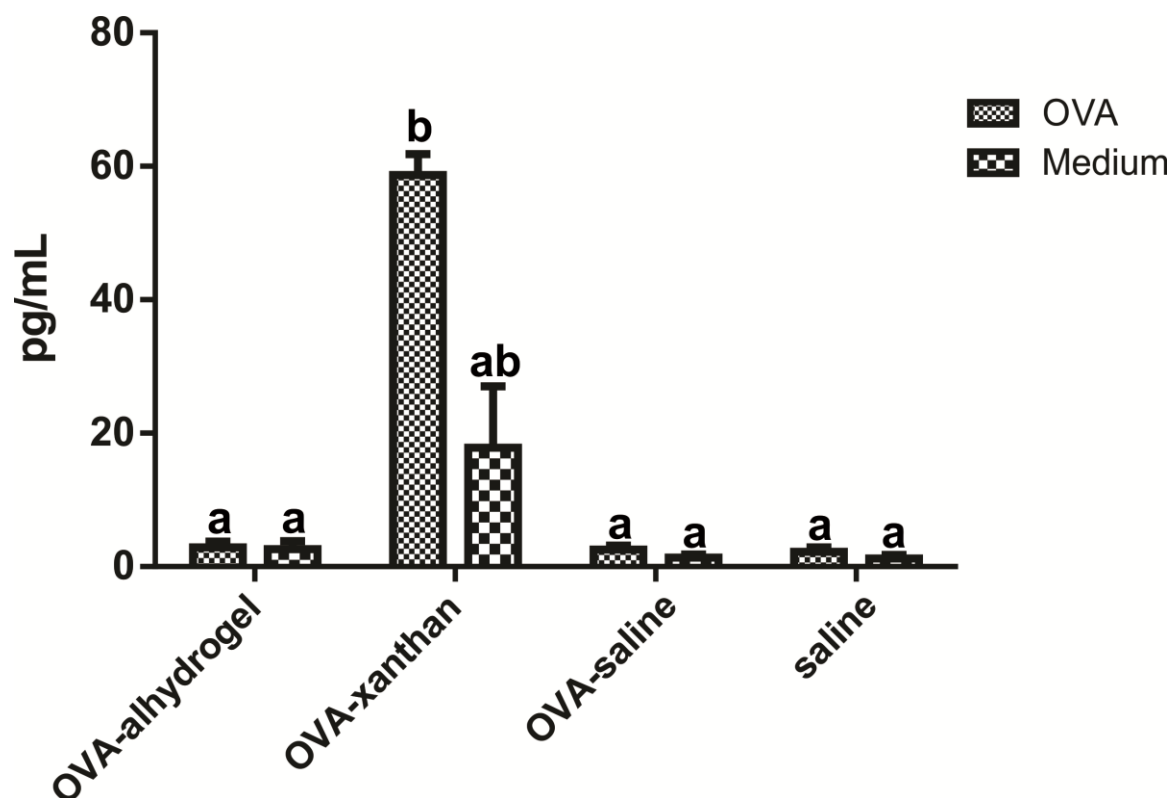


Fig 4.



827 Fig 5.

829 **References**

- 830 1. Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol*
831 2007;5:505–517.
- 832 2. De Gregorio E, Caproni E, Ulmer JB. Vaccine adjuvants: Mode of action. *Front*
833 *Immunol* 2013;4:1–6.
- 834 3. Clements CJ, Griffiths E. The global impact of vaccines containing aluminium
835 adjuvants. *Vaccine* 2002;20:24–33.
- 836 4. Reed SG, Orr MT, Fox CB. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med*
837 2013;19:1597–1608.
- 838 5. Tritto E, Mosca F, De Gregorio E. Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants.

- 839 *Vaccine* 2009;27:3331–4.
- 840 6. Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug*
841 *Discov* 2006;5:471–484.
- 842 7. van Duin D, Medzhitov R, Shaw AC. Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends*
843 *Immunol* 2006;27:49–55.
- 844 8. Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine
845 development. *Trends Immunol* 2009;30:23–32.
- 846 9. Lee S, Nguyen MT. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases.
847 *Immune Netw* 2015;15:51–7.
- 848 10. Petrovsky N, Cooper PD. Carbohydrate-based immune adjuvants. *Expert Rev Vaccines*
849 2011;10:523–37.
- 850 11. Shakya AK, Nandakumar KS. Applications of polymeric adjuvants in studying
851 autoimmune responses and vaccination against infectious diseases. *J R Soc Interface*
852 2013;10:20120536.
- 853 12. Garcia-Ochoa F, Santos VE, Casas JA, Gomez E. Xanthan gum: Production, recovery,
854 and properties. *Biotechnol Adv* 2000;18:549–579.
- 855 13. Erten T, Adams GG, Foster TJ, Harding SE. Comparative heterogeneity, molecular
856 weights and viscosities of xanthans of different pyruvate and acetate content. *Food*
857 *Hydrocoll.* 2014;42:335–341.
- 858 14. Ishizaka S, Sugawara I, Hasuma T, Morisawa S, Moller G. Immune responses to
859 xanthan gum. I. The characteristics of lymphocyte activation by xanthan gum. *Eur J*
860 *Immunol* 1983;13:225–231.

- 861 15. Chiou CJ, Tseng LP, Deng MC, Jiang PR, Tasi SL, Chung TW, et al. Mucoadhesive
862 liposomes for intranasal immunization with an avian influenza virus vaccine in
863 chickens. *Biomaterials* 2009;30:5862–5868.
- 864 16. Bertram U, Bernard M-C, Haensler J, Maincent P, Bodmeier R. *In situ* gelling nasal
865 inserts for influenza vaccine delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 2010;36:581–593.
- 866 17. Bacelo KL, Hartwig DD, Seixas FK, Schuch R, Moreira A da S, Amaral M, et al.
867 Xanthan gum as an adjuvant in a subunit vaccine preparation against leptospirosis.
868 *Biomed Res Int* 2014;2014:636491.
- 869 18. Carstens MG, Camps MGM, Henriksen-Lacey M, Franken K, Ottenhoff THM, Perrie
870 Y, et al. Effect of vesicle size on tissue localization and immunogenicity of liposomal
871 DNA vaccines. *Vaccine* 2011;29:4761–70.
- 872 19. Assudani D, Cho H-I, DeVito N, Bradley N, Celis E. *In vivo* expansion, persistence,
873 and function of peptide vaccine-induced CD8 T cells occur independently of CD4 T
874 cells. *Cancer Res* 2008;68:9892–9.
- 875 20. C. T. Vendruscolo, J. L. S. Vedruscolo and ASM. Process for Preparing a Xanthan
876 Biopolymer, WO/2006/047845. Universidade Federal de Pelotas, Empresa Brasileira
877 de Pesquisa Agropecuária; 2005.
- 878 21. Moreira AS, Vendruscolo JLS, Gil-Turnes C, Vendruscolo CT. Screening among 18
879 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv *pruni*. *Food Hydrocoll* 2001;15:469–74.
- 880 22. FAO/WHO. *Compendium of food additive specifications*. Addendum 7. Proc Jt
881 FAO/WHO Expert Comm Food Addit 53rd Sess. 1999;
- 882 23. Burdock G. *Encyclopedia of Food and Color Additives*. 3rd editio. CRC Press. NY,
883 USA; 1997.

- 884 24. Huang H, Ostroff GR, Lee CK, Specht CA, Levitz SM. Robust stimulation of humoral
885 and cellular immune responses following vaccination with antigen-loaded beta-glucan
886 particles. *MBio* 2010;1: e00164-10.
- 887 25. Moyer TJ, Zmolek AC, Irvine DJ. Beyond antigens and adjuvants: formulating future
888 vaccines. *JCI* 2016;126:799–808.
- 889 26. Dyondi D, Webster TJ, Banerjee R. A nanoparticulate injectable hydrogel as a tissue
890 engineering scaffold for multiple growth factor delivery for bone regeneration. *Int J*
891 *Nanomedicine* 2013;8:47–59.
- 892 27. Chellat F, Tabrizian M, Dumitriu S, Chornet E, Magny P, Rivard CH, et al. *In vitro* and
893 *in vivo* biocompatibility of chitosan-xanthan polyionic complex. *J Biomed Mater Res*
894 2000;51:107–16.
- 895 28. Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to
896 disease models. *Blood* 2012;119:5640–9.
- 897 29. Nimmerjahn F, Ravetch J V. Fcγ receptors as regulators of immune responses.
898 *Nat Rev Immunol* 2008;8:34–47.
- 899 30. Marrack P, McKee AS, Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action
900 of aluminium. *Nat Rev Immunol* 2009;9:287–93.
- 901 31. Zhao C, Li M, Luo Y, Wu W. Isolation and structural characterization of an
902 immunostimulating polysaccharide from fuzi, *Aconitum carmichaeli*. *Carbohydr Res*
903 2006;341:485–91.
- 904 32. Lai C-Y, Hung J-T, Lin H-H, Yu AL, Chen S-H, Tsai Y-C, et al. Immunomodulatory
905 and adjuvant activities of a polysaccharide extract of *Ganoderma lucidum* *in vivo* and
906 *in vitro*. *Vaccine* 2010;28:4945–54.

- 907 33. Savina A, Amigorena S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells.
908 *Immunol Rev* 2007;219:143–56.
- 909 34. Heath WR, Belz GT, Behrens GMN, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, et al. Cross-
910 presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens.
911 *Immunol Rev* 2004;199:9–26.
- 912 35. Rock KL, Shen L. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune
913 surveillance. *Immunol Rev* 2005;207:166–83.
- 914 36. Shen L, Rock KL. Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC
915 class I molecules. *Curr Opin Immunol* 2006;18:85–91.
- 916 37. Takeuchi A, Kamiryou Y, Yamada H, Eto M, Shibata K, Haruna K, et al. Oral
917 administration of xanthan gum enhances antitumor activity through Toll-like receptor
918 4. *Int Immunopharmacol* 2009;9:1562–7.
- 919 38. Rey-Ladino J, Ross AG, Cripps AW, McManus DP, Quinn R. Natural products and the
920 search for novel vaccine adjuvants. *Vaccine* 2011;29:6464–71.
- 921 39. Pasare C, Medzhitov R. Toll-Dependent Control Mechanisms of CD4 T Cell
922 Activation. *Immunity* 2004;21:733–41.
- 923 40. Pasare C, Medzhitov R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature*
924 2005;438:364–8.

5. DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

O polissacarídeo xantana possui aplicação voltada principalmente como aditivo alimentar aprovado pelo FDA desde 1969, sendo utilizado como um agente espessante e estabilizador (FAO/WHO 1999). No entanto, suas propriedades biológicas e seu mecanismo adjuvante não são claros e permaneceram pouco explorados até o momento. A partir dos resultados aqui apresentados, a constituição da xantana utilizada apresentaram resultados dentro dos padrões estabelecidos pela FAO, sem a presença significativa de níveis de LPS. Esse resultado é importante, pois exclui-se a atribuição do efeito imunogênico a esse composto contaminante (Mohan et al. 2013).

A avaliação dos possíveis efeitos tóxicos em estudos *in vitro* fornecem informações valiosas combinadas aos ensaios pré-clínicos. A avaliação de novos adjuvantes vacinais precisam ser, antes de mais nada, seguros e biocompatíveis para utilização *in vivo*. Assim, a citotoxicidade celular da xantana foi testada em linhagens NIH/3T3 de fibroblastos de camundongos cultivadas com diferentes concentrações do polissacarídeo. Para ambos os períodos de tratamento (24 e 48h), as concentrações testadas apresentaram taxas de inibição de crescimento inferior a 50%, não alterando a viabilidade celular. Além disso, as células exibiram morfologia normal quando observadas em microscopia de fluorescência e de contraste de fase. De forma semelhante, estudos prévios avaliaram a citotoxicidade *in vitro* da xantana e não foram observadas alterações na viabilidade celular (Chiou et al. 2009; Dyondi et al. 2013).

A capacidade do adjuvante vacinal em induzir respostas imune humoral e celular são fundamentais no desenvolvimento de vacinas efetivas (Reed et al. 2013). Os resultados apresentados mostraram que o polissacarídeo xantana foi capaz de induzir resposta humoral por IgG1 nos animais vacinados a partir da segunda dose administrada, em níveis superiores àqueles induzidos nos animais imunizados somente com ovalbumina. Além disso, os resultados da proliferação celular e quantificação da citocina INF- γ em cultivos de esplenócitos dos animais tratados com xantana sugerem a ativação da resposta celular através da ativação de células T CD4⁺ Th1 após o regime de imunização.

Porém, diversos aspectos envolvendo a ativação da resposta imune pelo polissacarídeo permanecem ainda inexploradas. As possíveis subpopulações de

células T e avaliação de diferentes mecanismos efetores são importantes parâmetros em novos adjuvantes (Zhou et al. 2009). Além disso, diferentes rotas de imunização podem ser avaliadas tanto no aspecto de imunogenicidade quanto de segurança do composto quando combinados com antígenos (Liang & Loré 2016).

6. CONCLUSÕES GERAIS

- 1) A xantana obtida de *Xanthomonas arboricola* pruni pv 106 não apresentou citotoxicidade nas diferentes concentrações testadas nos testes realizados *in vitro*;
- 2) As formulações contendo ovalbumina associada à xantana foram capazes de induzir uma resposta imune humoral mediada por IgG1 em camundongos superior a formulações contendo somente ovalbumina, porém inferiores à ovalbumina-alhydrogel;
- 3) Os animais imunizados com xantana tiveram uma resposta proliferativa e produção de INF- γ a partir dos cultivos de esplenócitos quando estimulados *ex vivo* com o antígeno ovalbumina maior que os demais grupos testados durante os experimentos.

7. REFERÊNCIAS

- Apostólico, J. de S. et al., 2016. Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. *Journal of immunology research*, 2016, p.1459394
- Atmar, R.L. & Keitel, W.A., 2009. Adjuvants for pandemic influenza vaccines. *Current topics in microbiology and immunology*, 333, pp.323–344.
- Awate, S., Babiuk, L.A. & Mutwiri, G., 2013. Mechanisms of action of adjuvants. *Frontiers in Immunology*, 4(MAY), pp.1–10.
- Bacelo, K.L. et al., 2014. Xanthan gum as an adjuvant in a subunit vaccine preparation against leptospirosis. *BioMed Research International*, 2014.
- Barre-Sinoussi, F. et al., 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, N.Y.)*, 220(4599), pp.868–871.
- Bertram, U. et al., 2010. In situ gelling nasal inserts for influenza vaccine delivery. *Drug development and industrial pharmacy*, 36(5), pp.581–593.
- Billiau, a & Matthys, P., 2001. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *Journal of leukocyte biology*, 70(6), pp.849–860.
- Cherry, J.D., 1996. Historical Review Of Pertussis And The Classical Vaccine. *Journal of Infectious Diseases* , 174 (Supplement 3), pp.S259–S263.
- Chiou, C.J. et al., 2009. Mucoadhesive liposomes for intranasal immunization with an avian influenza virus vaccine in chickens. *Biomaterials*, 30(29), pp.5862–5868.
- Christensen, D., 2016. Vaccine adjuvants: why and how. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 5515(August), pp.23–32.
- Coffman, R.L., Sher, A. & Seder, R.A., 2010. Vaccine adjuvants: Putting innate immunity to work. *Immunity*, 33(4), pp.492–503.
- Crotty, S., 2014. T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. *Immunity*, 41(4), pp.529–542.
- Dyondi, D., Webster, T.J. & Banerjee, R., 2013. A nanoparticulate injectable hydrogel as a tissue engineering scaffold for multiple growth factor delivery for bone regeneration. *International Journal of Nanomedicine*, 8, pp.47–59.
- Erten, T. et al., 2014. Comparative heterogeneity, molecular weights and viscosities of xanthans of different pyruvate and acetate content. *Food Hydrocolloids*, 42, Part 3, pp.335–341.
- FAO/WHO, 1999. Compendium of food additive specifications. Addendum 7. *Proceedings of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 53rd Session*.
- Fox, C.B. & Haensler, J., 2013. An update on safety and immunogenicity of vaccines containing emulsion-based adjuvants. *Expert review of vaccines*, 12(7), pp.747–758.
- Garcia-Ochoa, F. et al., 2000. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, 18(7), pp.549–579.

- 1020 Garcon, N., Chomez, P. & Van Mechelen, M., 2007. GlaxoSmithKline Adjuvant
1021 Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. *Expert review of*
1022 *vaccines*, 6(5), pp.723–739.
- 1023 Garcon, N., Vaughn, D.W. & Didierlaurent, A.M., 2012. Development and evaluation
1024 of AS03, an Adjuvant System containing alpha-tocopherol and squalene in an oil-
1025 in-water emulsion. *Expert review of vaccines*, 11(3), pp.349–366.
- 1026 Garcon, N., Wettendorff, M. & Van Mechelen, M., 2011. Role of AS04 in human
1027 papillomavirus vaccine: mode of action and clinical profile. *Expert opinion on*
1028 *biological therapy*, 11(5), pp.667–677.
- 1029 Gelmann, E.P. et al., 1983. Proviral DNA of a retrovirus, human T-cell leukemia virus,
1030 in two patients with AIDS. *Science (New York, N.Y.)*, 220(4599), pp.862–865.
- 1031 De Gregorio, E., Caproni, E. & Ulmer, J.B., 2013. Vaccine adjuvants: Mode of action.
1032 *Frontiers in Immunology*, 4(JUL), pp.1–6.
- 1033 De Gregorio, E., Tritto, E. & Rappuoli, R., 2008. Alum adjuvanticity: unraveling a
1034 century old mystery. *European journal of immunology*, 38(8), pp.2068–2071.
- 1035 Gupta, R.K. et al., 1993. Adjuvants--a balance between toxicity and adjuvanticity.
1036 *Vaccine*, 11(3), pp.293–306.
- 1037 Guy, B., 2007. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature reviews.*
1038 *Microbiology*, 5(7), pp.505–517.
- 1039 Hagan, D.T.O. & Fox, C.B., 2015. Are we entering a new age for human vaccine
1040 adjuvants ? , 14(7), pp.909–911.
- 1041 Hu, J. et al., 2015. Carbohydrate-based vaccine adjuvants – discovery and
1042 development. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 10(10), pp.1133–1144.
- 1043 Ishii, K.J. et al., 2008. Host innate immune receptors and beyond: making sense of
1044 microbial infections. *Cell host & microbe*, 3(6), pp.352–363.
- 1045 Ishizaka, S. et al., 1983. Immune responses to xanthan gum. I. The characteristics of
1046 lymphocyte activation by xanthan gum. *European Journal of Immunology*, 13(3),
1047 pp.225–231.
- 1048 Iwasaki, A. & Medzhitov, R., 2015. Control of adaptive immunity by the innate immune
1049 system. *Nature Immunology*, 16(4), pp.343–353.
- 1050 Lee, S. & Nguyen, M.T., 2015. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious
1051 diseases. *Immune network*, 15(2), pp.51–7.
- 1052 Liang, F. & Loré, K., 2016. Local innate immune responses in the vaccine adjuvant-
1053 injected muscle. *Clinical & Translational Immunology*, 5(4), p.e74.
- 1054 Macallan DC, Borghans JAM, Asquith B., 2017. Human T Cell Memory: A Dynamic
1055 View. *Vaccines*, 5(1).
- 1056 MacLennan, C.A. & Saul, A., 2014. Vaccines against poverty. *Proceedings of the*
1057 *National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(34),
1058 pp.12307–12312.
- 1059 Mbow, M.L. et al., 2010. New adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol*, 22(3),
1060 pp.411–416.
- 1061 McAleer, W.J. et al., 1984. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature*,

- 1062 307(5947), pp.178–180.
- 1063 Medzhitov, R. & Janeway, C.J., 2000. The Toll receptor family and microbial
1064 recognition. *Trends in microbiology*, 8(10), pp.452–456.
- 1065 Mehta, S., Goyal, V. & Singh, K., 2015. Phase I (first-in-man) prophylactic vaccine's
1066 clinical trials: Selecting a clinical trial site. *Perspectives in Clinical Research*, 6(2),
1067 pp.77–81.
- 1068 Mohan, T., Verma, P. & Rao, D.N., 2013. Novel adjuvants & delivery vehicles for
1069 vaccines development: A road ahead. *The Indian Journal of Medical Research*,
1070 138(5), pp.779–795.
- 1071 Moser, C. et al., 2013. Influenza virosomes as vaccine adjuvant and carrier system.
1072 *Expert review of vaccines*, 12(7), pp.779–791.
- 1073 Moser, M. & Leo, O., 2010. Key concepts in immunology. *Vaccine*, 28 Suppl 3, pp.C2–
1074 13.
- 1075 O'Hagan, D.T. et al., 2013. The history of MF59(®) adjuvant: a phoenix that arose from
1076 the ashes. *Expert review of vaccines*, 12(1), pp.13–30.
- 1077 O'Hagan, D.T., Ott, G.S. & Van Nest, G., 1997. Recent advances in vaccine adjuvants:
1078 the development of MF59 emulsion and polymeric microparticles. *Molecular*
1079 *Medicine Today*, 3(2), pp.69–75.
- 1080 O'Hagan, D.T. & Singh, M., 2003. Microparticles as vaccine adjuvants and delivery
1081 systems. *Expert review of vaccines*, 2(2), pp.269–283.
- 1082 Oleszycka, E. & Lavelle, E.C., 2014. Immunomodulatory properties of the vaccine
1083 adjuvant alum. *Current opinion in immunology*, 28, pp.1–5.
- 1084 Ott, G. & Van Nest, G., 2006. Development of Vaccine Adjuvants: A Historical
1085 Perspective. *Vaccine Adjuvants and Delivery Systems*, (1), pp.1–31.
- 1086 Pasquale, A. et al., 2015. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond.
1087 *Vaccines*, 3(2), pp.320–343.
- 1088 Petrovsky, N. & Cooper, P.D., 2011. Carbohydrate-based immune adjuvants. *Expert*
1089 *review of vaccines*, 10(4), pp.523–537.
- 1090 Plotkin, S., 2014. History of vaccination. *Proceedings of the National Academy of*
1091 *Sciences of the United States of America*, 111(34), pp.12283–12287.
- 1092 Plotkin, S. a. & Plotkin, S.L., 2011. The development of vaccines: how the past led to
1093 the future. *Nature Reviews Microbiology*, 9(12), pp.889–893.
- 1094 Rappuoli, R. et al., 2011. Vaccines for the twenty-first century society. *Nature Reviews*
1095 *Immunology*, 11(March 2012), pp.865–872.
- 1096 Reed, S.G. et al., 2009. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends*
1097 *in Immunology*, 30(1), pp.23–32.
- 1098 Reed, S.G., Orr, M.T. & Fox, C.B., 2013. Key roles of adjuvants in modern vaccines.
1099 *Nature medicine*, 19(12), pp.1597–608.
- 1100 Rey-Ladino, J. et al., 2011. Natural products and the search for novel vaccine
1101 adjuvants. *Vaccine*, 29(38), pp.6464–6471.
- 1102 Sato, Y. & Sato, H., 1999. Development of acellular pertussis vaccines. *Biologicals :*
1103 *journal of the International Association of Biological Standardization*, 27(2), pp.61–

- 1104 69.
- 1105 Schwendener, R.A., 2014. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the
1106 recent advances. *Therapeutic advances in vaccines*, 2(6), pp.159–182.
- 1107 Shakya, A.K. & Nandakumar, K.S., 2013. Applications of polymeric adjuvants in
1108 studying autoimmune responses and vaccination against infectious diseases.
1109 *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 10(79), p.201-205.
- 1110 Stanberry, L.R. & Strugnell, R., 2011. Vaccines of the future. *Perspectives in*
1111 *Vaccinology*, 1(1), pp.151–199.
- 1112 Takeuchi, A. et al., 2009. Oral administration of xanthan gum enhances antitumor
1113 activity through Toll-like receptor 4. *International Immunopharmacology*, 9(13-14),
1114 pp.1562–1567.
- 1115 Valenzuela, P. et al., 1982. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen
1116 particles in yeast. *Nature*, 298(5872), pp.347–350.
- 1117 Wen, Y. & Shi, Y., 2016. Alum: an old dog with new tricks. *Emerging microbes &*
1118 *infections*, 5(3), p.e25.
- 1119 Wilson-Welder, J.H. et al., 2009. Vaccine adjuvants: current challenges and future
1120 approaches. *Journal of pharmaceutical sciences*, 98(4), pp.1278–1316.
- 1121 Zepp, F., 2010. Principles of vaccine design-Lessons from nature. *Vaccine*, 28 Suppl
1122 3, pp.C14–24.
- 1123 Zhou, L., Chong, M.M.W. & Littman, D.R., 2009. Plasticity of CD4+ T Cell Lineage
1124 Differentiation. *Immunity*, 30(5), pp.646–655.