

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Tese

**Emulsões de polissacarídeo bacteriano como
adjuvantes em vacinas recombinantes**

Ana Muñoz Vianna

Pelotas, 2018

Ana Muñoz Vianna

**Emulsões de polissacarídeo bacteriano como adjuvantes em vacinas
recombinantes**

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

Orientador: Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

V617e Vianna, Ana Muñoz

Emulsões de polissacarídeo bacteriano como adjuvantes em vacinas recombinantes / Ana Muñoz Vianna ; Fábio Pereira Leivas Leite, orientador. — Pelotas, 2018.

79 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Adjuvante. 2. Ema-2. 3. Toxina épsilon. 4. Vacina recombinante. I. Leite, Fábio Pereira Leivas, orient. II. Título.

CDD : 615.372

Elaborada por Maria Beatriz Vaghetti Vieira CRB: 10/1032

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (orientador)

Prof. Dra. Daniela Isabel Brayer Pereira (Universidade Federal de Pelotas)

Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição (Universidade Federal de Pelotas)

Dr. Rodrigo Casquero Cunha (Universidade Federal de Pelotas)

Dedico esse trabalho à minha família, que
muito me apoiou e incentivou a realizá-lo.

Agradecimentos

Agradeço ao Carlos, Nathalia e Rodrigo pelo amor, companheirismo, incentivo e paciência. Aos meus pais, irmãos e demais familiares pelo incentivo e força que sempre me proporcionaram.

Muito obrigada ao meu Orientador Professor Dr. Fábio Pereira Leivas Leite pela confiança, compreensão, paciência e amizade.

Um agradecimento especial à amiga e colega Dra. Ana Paula Stori de Lara pelo auxílio e amizade e aos demais integrantes do laboratório de Parasitologia Molecular (Lab. XI) Jéssica Lopes, Guilherme Weege, Alice Correa, Natalia Al-Alam e Nycole Acunha.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia (Lab.4 – Biotecnologia) Dr. Rodrigo Cunha, Vitória Gonçalves, Pedro Albuquerque, Paulo Ricardo, Carolina Dias e principalmente ao colega e amigo Denis Santos, muito obrigado por sempre me atenderem e auxiliado.

Agradeço também aos colegas e amigos Carolina Brasil e Marcos Ferreira que me auxiliaram nas mais diversas etapas do trabalho, principalmente na coleta de material dos animais. Aos professores Luciana Ávila, Daniela Pereira, Fabricio Conceição e Rodrigo Cunha pelas participações em minhas bancas de qualificação e de defesa de tese e ao apoio dado sempre que necessitei.

Um agradecimento especial aos colegas do Hospital Veterinário, aos funcionários da Fazenda da Palma, ao Veterinário Sérgio Muñoz e aos funcionários da Fazenda Sant' Ana, pelo fornecimento de material e auxílio no manuseio dos animais.

Muito obrigada!

Resumo

VIANNA, Ana Muñoz. **Emulsões de polissacarídeo bacteriano como adjuvantes em vacinas recombinantes**. 2018. 79f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

As vacinas provaram ser eficazes na prevenção de doenças que anteriormente tinham alta morbidade e mortalidade. Devem ser administradas antecipadamente à exposição a patógenos, com tempo suficiente para a indução de memória imunológica específica para o antígeno. A vacinação com antígenos recombinantes, que em geral são menos imunogênicos, resulta em uma modesta ativação de linfócitos T e baixa indução de anticorpos. Para superar essa deficiência, estes antígenos são incorporados a formulações adjuvantes com a finalidade de ampliar a resposta imune vacinal. Nesse estudo foi desenvolvido um adjuvante (EPB) sob a forma de uma emulsão tripla, água/óleo/água, usando o polissacarídeo bacteriano goma xantana e o óleo Montanide ISA 50 V2[®]. A emulsão foi inócua para camundongos, equinos e bovinos, apresentando seringabilidade, e manteve-se estável por 6 meses sob refrigeração (4 °C). Sua eficiência imunogênica foi avaliada frente aos antígenos recombinantes Equi Merozoíto Antígeno (rEMA-2) de *Theileria equi* e Toxina Épsilon (rETX) de *Clostridium perfringens*. Os grupos experimentais vacinados com a EPB emulsionados ao antígeno rEMA-2, tanto dos camundongos como dos equinos, apresentaram níveis de IgG sérica total significativamente superior quando comparados aos grupos vacinados com o hidróxido de alumínio ($p < 0,05$) e a EPB sozinha ($p < 0,01$). Os isotipos IgG1 e IgG2a dos soros (pool) dos camundongos, coletados nos dias 28 e 60, foram avaliados por ELISA. No dia 60 observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de IgG2a no grupo vacinado com a EPB em relação ao dia 28, sugerindo uma modulação para uma resposta Th1. Os bovinos vacinados com a rETX emulsionado com a PSB apresentaram títulos séricos de IgG total contra a rETX significativamente superior ($p < 0,05$) ao grupo que recebeu o hidróxido de alumínio como adjuvante. Nos animais vacinados com a proteína rETX emulsionados com PSB foi observado aumento significativo ($p < 0,05$) da transcrição de mRNA das citocinas IL-2 (3,5 x), IL-15 (3,8 x) e IL-17 (2 x) em leucócitos periféricos, quando estimuladas com a proteína rETX e comparadas ao grupo hidróxido de alumínio. Os resultados deste estudo demonstraram que a emulsão tripla adjuvante desenvolvida é inócua, estável e possui uma ação promissora como adjuvante vacinal com as proteínas recombinantes testadas.

Palavras-chave: Adjuvante, EMA-2, Toxina Épsilon, Vacina recombinante.

Abstract

VIANNA, Ana Muñoz. **Emulsões de polissacarídeo bacteriano como adjuvantes em vacinas recombinantes**. 2018. 79f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Vaccines proved to be effective in preventing diseases that previously had high morbidity and mortality. They should be administered in advance of exposure to pathogens, with sufficient time to induce antigen-specific immune memory. Vaccination with recombinant antigens, which are generally less immunogenic, results in modest activation of T lymphocytes and low induction of antibodies. To overcome this deficiency, these antigens are incorporated into adjuvant formulations in order to enhance the vaccine immune response. In this study an adjuvant (EPB) was developed in the form of a triple emulsion, water/oil/water, using the bacterial polysaccharide xanthan gum and the Montanide ISA 50 V2® oil. The emulsion was innocuous for mice, horses and cattle, showing seringability, and remained stable for 6 months under refrigeration (4 °C). Its immunogenic efficiency was evaluated against the recombinant Equi Merozoite Antigen (rEMA-2) from *Theileria equi* and Epsilon Toxin (rETX) from *Clostridium perfringens*. Experimental groups vaccinated with EPB emulsified to the rEMA-2 antigen from both mice and horses showed significantly higher total serum IgG levels when compared to groups vaccinated with aluminum hydroxide ($p < 0.05$) and EPB alone ($p < 0.01$). IgG1 and IgG2a isotypes of the mice serum pools collected on days 28 and 60 were evaluated by ELISA. On day 60 a significant ($p < 0.05$) increase of IgG2a levels was observed in the vaccinated group with EPB in relation to day 28, suggesting a modulation for a Th1 response. The bovines vaccinated with rETX emulsified with PSB had serum titers of total IgG against rETX significantly higher ($p < 0.05$) than the group that received aluminum hydroxide as an adjuvant. A significant increase ($p < 0.05$) in cytokines IL-2 (3.5 x), IL-15 (3.8 x) and IL-17 (2.0 x) mRNA transcription was observed in animals vaccinated with the rETX protein emulsified with PSB in peripheral leukocytes when stimulated with the rETX protein and compared to the aluminum hydroxide group. The results of this study demonstrated that the triple emulsion adjuvant developed is innocuous, stable and has a promising action as a vaccine adjuvant with the recombinant proteins tested.

Keywords: Adjuvant, EMA-2, Epsilon toxin, Recombinant vaccine.

Lista de Figuras

Figura 1.	Representação esquemática das estruturas da emulsão múltipla.....	29
Figura 2.	Curva de Viscosidade.....	32
Figura 3.	Níveis séricos totais de IgG por ELISA de camundongos vacinados com rEMA-2.....	41
Figura 4.	Perfil de isotipos de imunoglobulinas em camundongos vacinados com rEMA-2.....	42
Figura 5.	Níveis séricos totais de IgG por ELISA de equinos vacinados com rEMA-2.....	43
Figura 6.	Titulação dos níveis de IgG em equinos vacinados com rEMA-2.....	44
Figura 7.	Níveis séricos totais de IgG por ELISA de bovinos vacinados com rETX.....	54
Figura 8.	Transcrição relativa da citocinas em PBL.....	55

Lista de Abreviaturas e Siglas

APC	<i>Antigen Presenting Cell</i> (Célula apresentadora de antígeno)
CFA	<i>Freund's complete adjuvant</i> (Adjuvante completo de Freund)
DNA	<i>DeoxyriboNucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensaio imunoenzimático)
EHL	Equilíbrio Hidrófilo- Lipófilo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IFA	<i>Freund's incomplete adjuvant</i> (Adjuvante incompleto de Freund)
IFNY	Interferon Gama
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
MFL	Monofosforil Lipídio A
NOD	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> (Padrões moleculares associados a patógenos)
PBL	<i>Peripheral Blood Leucocytes</i> (linfócitos do sangue periférico)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato-salino)
PMN	Polimorfonucleares
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i> (Receptores de Reconhecimento Padrão)
PSB	Polissacarídeo Bacteriano
SC	Subcutânea
SFB	Soro Fetal Bovino
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase quantitativa)
Th	Linfócito T helper
TLR	<i>Toll-Like Receptors</i>

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Vacinas	13
2.2 Adjuvantes	16
2.3 Emulsões adjuvantes	20
2.4 Polissacarídeos bacterianos (PSB)	22
2.5 Proteínas recombinantes	24
3 HIPÓTESE E OBJETIVO	26
3.1 Hipótese	26
3.2 Objetivo geral	26
3.3 Objetivos específicos:	26
4 CAPÍTULOS	27
4.1 Emulsão adjuvante.....	27
4.1.1 Material e Métodos	28
4.1.2 Resultados	31
4.1.3 Discussão	32
4.1.4 Conclusão	35
4.2 <i>Theileria equi</i>	36
4.2.1 Material e Métodos	37
4.2.2 Resultados	40
4.2.3 Discussão	45
4.2.4 Conclusão	49
4.3 <i>Clostridium perfringens</i>	50
4.3.1 Material e Métodos	51
4.3.2 Resultados	53
4.3.3 Discussão	55
4.3.4 Conclusão	59
5 DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS	60
6 CONCLUSÃO GERAL.....	64
7 REFERÊNCIAS	65
8 ANEXOS	78

1 INTRODUÇÃO GERAL

A Organização mundial da saúde (WHO, *World Health Organization*, 2017) define vacina como: “Uma vacina é uma preparação biológica que melhora a imunidade a uma doença específica. Uma vacina tipicamente contém um agente que se assemelha a um micro-organismo causador de doenças, e é frequentemente feita de formas enfraquecidas ou mortas do micróbio, suas toxinas ou uma de suas proteínas de superfície. O agente estimula o sistema imunológico do corpo a reconhecer o agente como estranho, destruí-lo e "lembrá-lo", de modo que o sistema imunológico possa reconhecer e destruir mais facilmente qualquer um desses micro-organismos quando o encontrar posteriormente”. As vacinas são medicamentos administrados basicamente a indivíduos saudáveis, sendo considerada uma das intervenções efetuadas pela saúde pública melhor sucedida (WHO, 2017).

Devido aos riscos de segurança associados às vacinas que utilizam patógenos completos atenuados ou mortos como antígenos vacinais, as vacinas mais recentes baseiam-se em antígenos recombinantes altamente purificados (Strugnell et al. 2011; Pellegrino et al. 2015; Pasquale et al. 2015). Vacinas que contenham um número limitado de antígenos purificados geralmente tem perfis de segurança melhorados, mas são geralmente menos imunogênicas devido à remoção de características patogênicas do organismo (Pasquale et al. 2015). Essas vacinas resultam em uma modesta indução de resposta humoral e celular e necessitam múltiplas vacinações para obtenção de resposta imune suficiente (Pellegrino et al. 2015). Para superar essa insuficiência, adjuvantes são adicionados a formulações de vacinas com a finalidade de indução de uma resposta imune mais ampla, intensa e rápida e a redução da dose administrada (Seubert et al. 2008; Josefsberg & Buckland, 2012).

Os adjuvantes são utilizados em vacinas há mais de 90 anos. Foram inicialmente usados de maneira empírica para melhorar a resposta imune ao antígeno, mas se tornaram componentes necessários de muitas vacinas devido à baixa imunogenicidade dos antígenos purificados utilizados (Pasquale et al. 2015).

Em meados da década de 1990, os avanços em imunologia mudaram as estratégias para a descoberta, “design”, desenvolvimento e uso de adjuvantes vacinais. As descobertas de receptores que sinalizam rapidamente a presença de

invasores tais como, vírus, bactérias e parasitos, apontaram o sistema imune inato como alvo dos adjuvantes (Hackett & Harn, 2006). Os adjuvantes fornecem a proteção física aos antígenos, auxiliam na translocação do antígeno para o linfonodo e aumentam a resposta do sistema imunológico, mediando uma exposição mais longa e efetiva do antígeno às células imunes (Butnaru & Shoefeld, 2015).

Os polissacarídeos de origem microbiana surgiram no mercado internacional a partir da década de 1950 para aplicação nas indústrias farmacêutica e alimentícia. A produção desses polissacarídeos, em condições controladas de fermentação, garante um material de qualidade (Sutherland, 2001; Ernandes & Garcia-Cruz, 2005; Luvielmo & Scamparini, 2009). A esse grupo de polissacarídeos, solúveis em água, de origem vegetal, animal ou microbiológica, foi dado a designação de gomas industriais (Luvielmo & Scamparini, 2009).

A goma xantana é um polissacarídeo bacteriano derivado da bactéria *Xanthomonas* spp. Seu uso foi liberado em 1969 na produção de alimentos pela FDA (*Food and Drug Administration*) (Luvielmo & Scamparini, 2009). A goma xantana é muito utilizada na indústria alimentícia por ser um espessante de soluções aquosas, agente dispersante, estabilizadora de emulsões e suspensões e apresentar compatibilidade com ingredientes alimentícios (Chiou et al. 2009).

Aproveitando as características emulsificantes, estabilizantes e imunogênicas da goma xantana, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma emulsão com o papel de adjuvante imunológico para ser usada junto com antígenos vacinais recombinantes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Vacinas

A vacinação apresenta impactos consideráveis na prevenção e controle de doenças infecciosas e morte provocada por essas em todo o mundo (WHO, 2017; Zheng et al. 2018). É uma opção de tratamento preventivo disponível há mais de 200 anos e provou ser eficaz na prevenção de infecções que anteriormente apresentavam alta morbidade e mortalidade (WHO, 2017).

Após a imunização, uma vacina deve provocar uma combinação de respostas humoral e celular capaz de controlar ou prevenir infecções (Pasquale et al. 2015; Zheng et al. 2018). O princípio básico subjacente à imunização é a indução de uma resposta imune capaz de fornecer proteção específica contra infecção ou doença, e onde o risco de adquirir a doença da vacinação foi reduzido ou removido. O indivíduo vacinado torna-se imune à doença em exposição futura, e os efeitos colaterais indesejados da doença induzida por patógenos são evitados (Pasquale et al. 2015).

No final do século XVIII, Edward Jenner utilizou o vírus vivo completo da varíola retirado de lesões da pele de animais para imunizar pessoas contra essa doença. Essa transferência de animal para humano e depois humano para humano teve a finalidade de imunizar contra a varíola humana, mais patogênica que a varíola animal (Josefsberg & Buckland, 2012). A palavra vacinação (latim: *vaccinus* = *cow*) originou-se desta primeira vacina, uma vez que foi derivada de um vírus que afeta as vacas (Josefsberg & Buckland, 2012). Este foi um trabalho pioneiro de vacinas virais com partículas capazes de se multiplicar nos vacinados (Schatzmayr, 2003). As vacinas bacterianas foram criadas por Louis Pasteur em 1880, como a vacina para cólera aviária (*Pasteurella multocida*) e a vacina para o antraz (*Bacillus anthracis*) usando culturas bacterianas enfraquecidas. A vacina da pólio foi o primeiro cultivo “in vitro” de uma vacina viral em células humanas não neurais por John Franklin Enders em 1949. A seguir Jonas Salk produziu uma vacina inativada contra poliomielite em células renais de macacos (Josefsberg & Buckland, 2012). O desenvolvimento de vacinas no início do século XX teve vários avanços como a identificação de toxinas bacterianas que poderiam ser modificadas para formas não

tóxicas, mantendo alta imunogenicidade e o uso de cultura celular para propagação e atenuação bacteriana e de vírus (Pellegrino et al. 2015). Os processos de atenuação de virulência tradicionalmente utilizados para a obtenção de vacinas vivas são obtidos por dessecação ou por passagem repetida em cultura e em diferentes condições, levando ao surgimento de mutantes cuja virulência seja reduzida/removida, mas o micro-organismo permanece viável (Schatzmayr, 2003; Pasquale et al. 2015).

Muitas vacinas vivas atenuadas e de micro-organismos completos inativados continuam a ser usadas no século XXI. No entanto, algumas dessas vacinas enfrentam dificuldades em termos de reatogenicidade, potência ou eficácia. Há ainda, a capacidade de reversão da virulência de estirpes de vacinas vivas atenuadas e inativação incompleta de bactérias ou vírus contidos nas vacinas, o que ocasionalmente pode causar doenças após a vacinação (Strugnell et al. 2011; Pasquale et al. 2015).

As vacinas devem ser avaliadas com base no seu impacto na saúde pública contra síndromes ou doenças (Saadatian-Elahi et al. 2016). Prevenir uma doença de alta prevalência já provou ser uma medida econômica e, como tal, as vacinas tornaram-se parte de vários programas nacionais de saúde. Como exemplo, a erradicação da varíola foi atribuída principalmente aos programas de vacinação bem-sucedidos. Esses resultados promissores levaram ao desenvolvimento de mais vacinas e ao estudo da sua aplicabilidade em outros campos, como a prevenção e o tratamento do câncer (Guimarães et al. 2015).

Para uso veterinário os protocolos de vacinação podem ser diferentes, ou não, daqueles para vacinas humanas, dependendo dos grupos de animais considerados. Fatores que influenciam a seleção de um adjuvante incluem espécie animal, patógeno específico, antígeno vacinal, via de imunização e tipo de imunidade necessária (Spickler & Roth, 2003). Vacinas para animais de companhia são similares às aquelas para vacinas humanas, pois a saúde do animal é um fator primordial. As vacinas para animais de produção (bovinos, suínos e aves), no entanto, procuram melhorar a produção geral e visam o custo-benefício resultante da vacinação (Meeusen et al. 2007). A vacinação contra infecções zoonóticas busca reduzir ou eliminar o risco para os seres humanos e, em alguns casos, melhorar a produtividade de cada animal. A vacinação da vida selvagem é geralmente considerada apenas no que diz respeito a infecções transmissíveis a seres humanos

(zoonoses), embora as questões de bem-estar sejam cada vez mais importantes (Meeusen et al. 2007).

As vacinas são eficazes na proteção de longa duração contra muitas infecções de ocorrência natural, desde que sejam administradas profilaticamente à exposição a patógenos, com tempo suficiente para a indução de memória imunológica específica para o antígeno. Promovem um grande impacto na diminuição das doenças e aumentam a expectativa de vida (O'Hagan & Valiante, 2003). As vacinas podem levar a uma proteção duradoura. Em animais de companhia, por exemplo, há casos em que a imunidade persiste por toda a vida. No entanto, cada vacina deve ser avaliada com base em seus próprios méritos e nas características da doença a que se destina a proteção (Coyne et al. 2001).

Devido aos riscos de segurança associados às vacinas feitas de patógenos atenuados ou mortos, antígenos específicos podem ser produzidos por tecnologia do DNA recombinante, e principalmente pela tecnologia denominada vacinologia reversa (Schatzmayr, 2003). Na vacinologia reversa é feito o sequenciamento do genoma do agente, análise de suas proteínas, provável posição no micro-organismo e capacidade teórica de produzir resposta imune. Os peptídeos selecionados são sintetizados ou expressos em vetores e testados em animais para comprovação da resposta imune (Schatzmayr, 2003).

A tecnologia do DNA recombinante permitiu a produção de vacinas para agentes patogênicos que não podem ser cultivados *in vitro* e também melhorou a eficiência dos processos de fabricação e purificação dos antígenos (Strugnell et al. 2011; Pellegrino et al. 2015). A vacinação com antígenos purificados é bem tolerada e geralmente mantém perfis de segurança melhorados em comparação com vacinas de patógenos completos, no entanto, são geralmente menos imunogênicas devido à remoção de características patogênicas do organismo (Pellegrino et al. 2015).

Devido à baixa imunogenicidade de alguns antígenos e com o objetivo de aumentar a resposta imune, produtos denominados adjuvantes são adicionados a formulações de vacinas (Seubert et al. 2008; Josefsberg & Buckland, 2012).

2.2 Adjuvantes

O termo "adjuvante" é derivado da palavra latina "adjuvare" que significa "para ajudar". Em *Annals de L'Institut Pasteur*, 1926, foi citado a primeira vez por Gaston Ramon, o reconhecido pai da pesquisa de adjuvantes. Em uma série de artigos que começaram em 1925, Ramon e colaboradores observaram um fenômeno interessante ao tentar gerar antitoxina diftérica em cavalos (Spriggs & Koff, 1991). O termo foi empregado para definir um produto, que ao ser utilizado em combinação com um antígeno específico, induz a uma resposta imunológica mais intensa que aquela produzida com o antígeno sozinho (O'Hagan et al. 2012). Em vacinas o termo é empregado para qualquer material que potencialize a resposta imune celular e humoral frente a um antígeno (Mutiso et al. 2010).

Alexander Glenny, trabalhando em Londres, descobriu os efeitos imunológicos dos sais de alumínio (Marrack et al. 2009). O alumínio foi utilizado pela primeira vez em vacinas humanas em 1932 e foi o único adjuvante usado em vacinas licenciadas por aproximadamente 70 anos. Apesar do seu uso extensivo e contínuo, o mecanismo imune de ação do alumínio permanece não totalmente compreendido. Os adjuvantes contendo sais de alumínio atuam principalmente aumentando a produção de anticorpos, entretanto são fracos indutores de respostas celulares, desta forma, não são bem sucedidos na prevenção de infecções por patógenos intracelulares (Marrack et al. 2009).

Os adjuvantes inicialmente foram usados para lidar com o fraco potencial imunogênico de alguns antígenos. Entretanto, nos últimos anos, o papel dos adjuvantes se expandiu impulsionado paralelamente ao desenvolvimento na tecnologia e na compreensão da imunologia da vacinação (Hackett & Harn, 2006; Pasquale et al. 2015). Futuros desenvolvimentos na tecnologia adjuvante devem fornecer respostas imunológicas mais fortes e aumentar a resposta imune em populações específicas, que podem responder insatisfatoriamente a determinada vacina (Stanberry & Strugnell, 2011; Pasquale et al. 2015).

Os adjuvantes aumentam a potência da vacina em grande parte ativando a imunidade inata e promovendo a inflamação (Josefsberg & Buckland, 2012). Entretanto, limitar os efeitos colaterais desta inflamação é um grande obstáculo para o uso de adjuvante em vacinas para humanos (Wu et al. 2014). A maioria dos

adjuvantes age estimulando o sistema imunológico por meio de dois mecanismos básicos: primeiro, carregam a propriedade de adjuvante / potenciador no sistema imunológico e, segundo, podem agir como substâncias estranhas capazes de induzir uma reação por meio da ativação de inflamossomos (Butnaru & Shoefeld, 2015).

Os adjuvantes possuem uma função essencial na estimulação das células apresentadoras de antígeno (APCs) ao ligarem-se aos receptores que incluem os *Toll-Like Receptors* (TLRs) e *Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing 2* (NOD2). Essas APCs secretam as citocinas que desencadeiam respostas Th1, Th2, Th17, Treg (Hackett & Harn, 2006) e também Th9 (Thakur et al. 2015) e Th22 (Sommer & Fabri, 2015). Macrófagos, células dendríticas e polimorfonucleares (PMN) apresentam TLRs que funcionam como receptores de reconhecimento padrão (PRR) responsáveis pelo reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), os quais estão presentes nos agentes infecciosos. Dessa forma, a ativação da imunidade inata, a partir da associação PRR-PAMP, é um passo crucial no desenvolvimento da imunidade adquirida contra os antígenos específicos (Ferraz et al. 2011). O envolvimento de TLR pela maioria dos adjuvantes resulta em ativação e diferenciação dos linfócitos T. No entanto, o mesmo TLR pode induzir a produção de diferentes citocinas dependendo em qual APC ele está sendo expresso, por exemplo, a ligação de um adjuvante ao TLR7 de uma célula dendrítica plasmocitoide resultará na expressão de IFN- α , mas de IL-12 se for por células dendríticas mieloides (Hackett & Harn, 2006). Os adjuvantes também geram a formação de depósitos de antígenos nos tecidos (Hunter, 2002) e podem reduzir o número de doses requeridas para alcançar proteção, bem como, diminuir a concentração do antígeno (Harper et al. 2006; Banzhoff et al. 2009; Schwarz et al. 2009).

Segundo Awate et al. (2013) os adjuvantes podem atuar através de uma combinação de vários mecanismos, incluindo a formação de depósito, a indução de citocinas e quimiocinas, o recrutamento de células do sistema imune, o aumento da absorção e apresentação de antígenos, e promover o transporte de antígeno para os gânglios linfáticos. Os adjuvantes podem aumentar a capacidade imunogênica de peptídeos sintéticos ou de antígenos pequenos e imunogenicamente fracos; podem aumentar a velocidade, intensidade, e a persistência da resposta imune (O'Hagan, 2000; Awate et al. 2013).

Os adjuvantes podem aumentar a resposta imune à vacina em indivíduos imunologicamente imaturos, imunossuprimidos ou superar a imunossenescência (O'Hagan, 2000; Lee et al. 2009). Podem modular a imunidade humoral ou mediada por células de várias maneiras; os adjuvantes de vacina podem modular o isotipo dos anticorpos contra epítomos em imunógenos específicos, bem como a avidéz, a especificidade e a quantidade. Os adjuvantes de vacina podem diminuir a quantidade de antígenos em vacinas combinadas, reduzindo assim a probabilidade de competição entre os antígenos e supressão de epítomos específicos (O'Hagan, 2000). O adjuvante deve ser estável, ser aplicado com um amplo espectro de antígenos vacinais, de fácil fabricação e baixo custo (O'Hagan & Singh, 2003).

Os adjuvantes podem ser classificados em dois grandes grupos: os de sistemas de distribuição, como os sais de alumínio ou MF59, e os potencializadores do sistema imunológico, tais como monofosforil lipídio A (MFL) ou o oligonucleotídeo CpG (O'Hagan et al. 2012). Já foram classificados em adjuvantes particulados como os sais de alumínio, as emulsões de água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A), os complexos imunoestimulantes (ISCOM), lipossomos, micro e nanopartículas e adjuvantes não particulados como o muramil dipeptídeo e derivados, saponinas, lipídeo A, citocinas, polímeros de carboidratos e toxinas bacterianas (Cox & Coulter, 1997; Mota et al. 2006).

Segundo Cox & Coulter (1997), os adjuvantes podem atuar por cinco caminhos: imunomodulação, apresentação, indução de linfócitos T CD8⁺, liberação ou entrega do antígeno e o efeito depósito. Estes cinco mecanismos básicos mudam à medida que se expande o conhecimento imunológico (O'Hagan, 2000).

Certos adjuvantes modulam as respostas pela sinalização via TLRs: como LPS (Lipopolissacarídeos) via TLR4; PGN (Peptideoglicanos) via TLR2; Flagelina via TLR5 e CpG via TLR9 (Martinon et al. 2006; Eisenbarth et al. 2008). O hidróxido de alumínio não sinaliza via TLRs, mas ativa caspase-1 e induz a produção de IL-1 β e IL-18 via receptores NALP3 (*NATCH-LRR- and pyrin-domain-containing proteins*) (Martinon et al. 2006; Eisenbarth et al. 2008; Mirotti et al. 2017). O hidróxido de alumínio é amplamente utilizado em vacinas para humanos e animais há mais de 90 anos, no entanto, estudos sobre os mecanismos de ação e sinalização subjacentes a sua atividade ainda estão em andamento (Mirotti et al. 2017). O adjuvante MF59 (Novartis) na forma de emulsões óleo/água foi licenciado para uso humano (vacina da gripe) somente em 1997 (Mosca et al. 2008; Kommareddy et al. 2017).

O alumínio emulsionado tem sido usado com sucesso em formulações de uma ampla variedade de vacinas para animais. Infelizmente está associado com osteossarcoma em gatos e, portanto, não é mais usado em vacinas para essa espécie (Garg et al. 2017). No entanto, com os novos conhecimentos do sistema imunológico, vários adjuvantes têm sido desenvolvidos para aplicações em vacinas veterinárias como as saponinas, lipossomos, virossomos e ligantes de receptores tipo Toll. Uma ampla gama de adjuvantes tem sido utilizada com sucesso em vacinas comerciais veterinárias, entretanto novas tecnologias como micropartículas, nanopartículas e partículas semelhantes a vírus encontram-se em fase pré-clínica de desenvolvimento e testes (Garg et al. 2017).

As vacinas com adjuvantes oleosos são utilizadas em programas de controle de doenças veterinárias e induzem a uma resposta imune elevada e duradoura, mas seu uso frequente pode resultar em reações adversas indesejáveis, tais como, formação de granulomas e cistos. Essas reações adversas são atribuídas principalmente a impurezas do óleo (Mota et al. 2006; Pellegrino et al. 2015). O uso do adjuvante completo de Freund (CFA), que é um adjuvante de base oleosa, é inaceitável em bovinos porque as micobactérias presentes no adjuvante podem induzir uma reação cutânea positiva à tuberculina, além da presença do óleo mineral (Aucouturier et al. 2001).

Para atender às necessidades do mercado veterinário de vacinas e para melhorar a eficácia e estabilidade de vacinas em animais, a empresa SEPPIC (SEPPIC, Paris, França) desenvolveu os adjuvantes Montanide™, amplamente utilizados, baseados em três tecnologias: emulsões, micro emulsões e polímeros.

Os adjuvantes aprovados para vacinas humanas são: sais de alumínio, MF59 em algumas vacinas virais, MPL, AS04, AS01B e AS02A contra infecções virais e parasitárias, virossomas para o vírus da hepatite B (VHB), vírus do papiloma humano (HPV), vírus da hepatite A (VHA) e cólera (Guimarães et al. 2015). As dificuldades no licenciamento de novas vacinas, bem como os poucos adjuvantes aprovados para uso humano (Tritto et al. 2009; Hora et al. 2011), leva as novas pesquisas ao desenvolvimento de novos adjuvantes que aumentem a imunidade inata e a eficácia vacinal (Chen et al. 2010; Pasquale et al. 2015). O uso de adjuvantes na vacinologia veterinária é muito menos restrito do que em vacinas humanas, e um grande número de diferentes tipos e formulações de adjuvantes são usados atualmente em vacinas veterinárias licenciadas. No entanto, algumas

informações sobre os adjuvantes de uso veterinário são protegidas pelos fabricantes (Meeusen et al. 2007).

Os adjuvantes modernos estão sendo projetados para ajudar a superar os desafios na prevenção de doenças infecciosas de significância global para as quais as vacinas que se utilizaram de métodos tradicionais não foram bem sucedidas (Pasquale et al. 2015). A segurança em longo prazo do alumínio é considerada como certa, o que significa que qualquer nova vacina que o contenha não é forçada a ultrapassar os mesmos obstáculos que uma vacina contendo qualquer adjuvante mais recente (Petrovsky & Cooper, 2011).

2.3 Emulsões adjuvantes

Uma emulsão pode ser definida como dispersões de um líquido em outro (Peyrefitte et al. 1998). É um sistema heterogêneo, constituído por, pelo menos, um líquido imiscível, intimamente disperso em outro líquido, sob a forma de gotículas que encapsulam camadas de óleo e água da fase contínua. Em emulsões múltiplas um ingrediente ativo pode ser sequestrado dentro das gotículas internas e liberado subsequentemente. Por isso as emulsões múltiplas são veículos úteis para entrega de drogas e ensaios bioquímicos (Haase & Brujic, 2014). São sistemas com pouca estabilidade, que pode ser aumentada pela adição de substâncias denominadas tensoativos (Prista et al. 1990; Aucouturier et al. 2002). Para formar uma emulsão, a tensão interfacial (entre as fases de óleo e água) precisa ser reduzida. Com a tensão interfacial diminuída, a área de contato aumenta. Esse aumento na área interfacial leva a um aumento da energia livre do sistema o que resulta na instabilidade termodinâmica. Além da escolha e quantidade do emulsionante adequado, a instabilidade da emulsão pode ser diminuída pela dispersão do tamanho das gotas, pelas diferenças de densidade entre as fases interna e externa, pela viscosidade da fase externa e pela técnica de fabricação (O'Hagan, 2000).

Os tensoativos apresentam diferentes graus de solubilidade nos óleos e na água. As porções, hidrófila e lipófila, não se equilibram perfeitamente (Schneider, 2001). Os emulsificantes são classificados pelo número EHL (Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo). O Conceito de EHL baseia-se no fato de que os tensoativos são constituídos por uma parte hidrossolúvel e a solubilidade final depende da proporção

das duas partes da mesma molécula. A composição química e a extensão da ionização determinam o EHL. O EHL do emulsificante contribui para o tipo de emulsão formada. Um EHL baixo promove uma emulsão água/óleo (A/O) e EHL alto promove uma emulsão óleo/água (O/A) - EHL mais elevados correspondem a maior hidrofília (O'Hagan, 2000; Schneider, 2001).

Emulsões adjuvantes aprovadas para uso clínico, como MF59 (Novartis), AF03 (Sanofi) e AS03 (GlaxoSmithKline) são gotículas dispersas em outro líquido imiscível (Pellegrino et al. 2015). A primeira evidência do uso de emulsões aquosas em óleo na formulação de vacinas foi registrada em 1916, por Le Moignic e Pinoy (Jansen et al. 2005). Algum tempo depois, Jules Freund desenvolveu o adjuvante completo de Freund (CFA), que continha micobactérias inativadas e o adjuvante incompleto de Freund (IFA). Ambos ficaram conhecidos como protótipos de emulsões de água e óleo de parafina (Jansen et al. 2005), o qual é tóxico para uso em vacinas (Pellegrino et al. 2015).

O MF59 é uma emulsão óleo/água, que utiliza pequenas (~ 160 nm de diâmetro) gotículas de óleo de esqualeno estabilizadas pela adição de dois surfactantes não iônicos (Tween 80 e Span 85) (Lippi et al. 2010; O'Hagan et al. 2012). O esqualeno é um composto orgânico natural e é um precursor dos hormônios esteroidais (O'Hagan et al. 2012). Obtido com fins comerciais, principalmente do óleo de fígado de tubarão, o esqualeno pode ser extraído também de fontes botânicas (Lippi et al. 2010), sendo um óleo totalmente metabolizável (O'Hagan et al. 2012). O mecanismo de ação do MF59 é pouco compreendido, no entanto, emulsões óleo/água similares estão sendo testados em ensaios clínicos. Em camundongos foi demonstrado que o MF59 induz o recrutamento de macrófagos para o local da injeção (Seubert et al. 2008).

Há também as emulsões múltiplas (triplas) como a dispersão em água de uma emulsão A/O (água/óleo/água) e dispersão em óleo de uma emulsão O/A (óleo/água/óleo) (Peyrefitte et al. 1998). Em geral, emulsões adjuvantes são consideradas tóxicas para vacinas humanas de rotina. Efeitos secundários frequentes de emulsão incluem reações inflamatórias, granulomas e úlceras no local da injeção especialmente como resultado do uso de óleos não biodegradáveis (Mohan et al. 2013).

2.4 Polissacarídeos bacterianos (PSB)

O crescente interesse por polissacarídeos microbianos para aplicação científica, farmacêutica e industrial deve-se a suas propriedades funcionais únicas e a capacidade de serem produzidos em condições controladas de fermentação, em menor período de tempo, garantindo um material de qualidade e fornecimento constante (Sutherland, 2001; Ernandes & Garcia-Cruz, 2005).

Numerosos polissacarídeos oriundos de plantas e micro-organismos foram testados como adjuvantes em vacinações (Schuch et al. 2017). Cada um desses adjuvantes de vacinas à base de carboidratos pode ser muito diferente um do outro e pode ter suas próprias características físicas e químicas, comportamento imunológico e atributos únicos. Os polissacarídeos desempenham um papel importante no sistema imunológico e têm a vantagem, com raras exceções, de alta biocompatibilidade e baixa toxicidade. Carboidratos são facilmente metabolizados ou excretados e desempenham um papel com pouco risco de gerar metabólitos tóxicos ou depósitos de tecidos de longo prazo, como ocorrem com sais de alumínio na condição conhecida como miofascite macrofágica (Petrovsky & Cooper, 2011).

A goma xantana, polissacarídeo sintetizado por bactéria fitopatogênica do gênero *Xanthomonas* spp., tem grande importância comercial sendo utilizada como um espessante, emulsificante e estabilizante na indústria. Quando a bactéria *Xanthomonas campestris* infecta a planta, ela produz o polissacarídeo de alto peso molecular para sua proteção contra a dessecação, ataque de amebas, fagócitos e bacteriófagos (Souza & Vendruscolo, 1999). Os micro-organismos são capazes de elaborar produtos com uma grande diversidade de estruturas químicas o que possibilita a obtenção de polímeros hidrossolúveis com diferentes propriedades (Souza & Vendruscolo, 1999; Luvielmo & Scamparini, 2009). Ao ser aprovada pelo FDA foi incorporada a inúmeros produtos em diferentes segmentos industriais, entre eles, alimentos, fármacos, cosméticos (Schneider, 2001), químico e petroquímico. Seu uso se deve principalmente a suas propriedades reológicas, que permitem a formação de soluções viscosas a baixas concentrações (0,05-1,0%), e estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura (Meyer et al. 1993; Scamparini et al. 2000; Navarrete et al. 2001; Fontaniella et al. 2002; Luvielmo & Scamparini, 2009). Quimicamente, considera-se um polieletrólito aniônico, com uma cadeia principal

celulósica. Na posição C(3) de cada resíduo de glucose alternada existe uma cadeia lateral trissacarídica contendo unidades de D-manose e ácido glucurônico que podem ser acetilados ou apresentar piruvatos em diferentes níveis, o que influencia as propriedades químicas e físicas da xantana. A cadeia lateral trissacarídica alinha-se com a cadeia celulósica principal, estabilizando a conformação por interações não covalentes (Luvielmo & Scamparini, 2009; Schuch et al. 2017).

As propriedades adjuvantes intrínsecas de goma xantana como um ativador de linfócitos murino foram originalmente descritos na década de 1980, mas mantiveram-se em grande parte inexploradas nas décadas seguintes. No entanto, suas propriedades adjuvantes já foram utilizadas com sucesso em formulações de vacinas contra herpes suíno tipo 1 em camundongos (Roos et al. 2009), em formulações intranasais com o vírus da influenza (Bertran et al. 2010) e também foi capaz de aumentar a imunogenicidade de antígenos recombinantes gerando proteção contra as cepas patogênicas de *Leptospira interrogans* (Bacelo et al. 2014; Schuch et al. 2017).

A dextrana é um polissacarídeo microbiano ramificado e juntamente com o seu derivado sulfatado, o sulfato de dextrana, tem múltiplas aplicações terapêuticas humanas. O sulfato de dextrana possui amplos efeitos pró-inflamatórios, como exemplificados pelo seu uso para induzir colite inflamatória em camundongos. Estes efeitos imunológicos levaram a estudos da capacidade da dextrana como adjuvante de vacina. O Dietilaminoetil (DEAE) - dextrana é um derivado policatiônico de dextrana que foi testado como um adjuvante veterinário e aumentou a resposta imune primária de macacos rhesus à vacina de vírus da encefalomielite equina inativada por formalina, com um tempo reduzido necessário para o início da produção de IgG (Petrovsky & Cooper, 2011).

Manana, polímero de manose, é um polissacarídeo de armazenamento produzido por leveduras, bactérias e plantas. A ligação de manana pelas lectinas do tipo C da família de receptores de manose conduz à complementação da ativação, opsonização e fagocitose. Manana também ativa o inflamossoma resultando na ativação da caspase 1 e produção de IL-1 e tem sido utilizada como adjuvante de vacinas para levar os antígenos para APCs (Petrovsky & Cooper, 2011).

2.5 Proteínas recombinantes

A técnica da produção de proteínas recombinantes envolve a inserção de uma molécula de DNA “estranho”, que codifica para determinada proteína em bactérias, leveduras, células de mamíferos e insetos. O desenvolvimento de novas vacinas procurou uma abordagem mais racional, com uma compreensão maior dos mecanismos de patogenicidade dos micro-organismos para serem usados com as tecnologias recombinantes (Pinto et al. 2011).

Nas vacinas de subunidade usam-se as partes imunogênicas do micro-organismo, o que reduz o potencial de reatogenicidade. Estas proteínas podem ser usadas como fonte de antígenos a serem incorporados, após purificação, nas formulações de vacinas (Diniz & Ferreira, 2010; Bashiru & Bahaman, 2018). Dentre as múltiplas aplicações da tecnologia do DNA recombinante, a produção de vacinas atraiu o interesse de pesquisadores (Pinto et al. 2011). O aprimoramento das técnicas de produção de proteínas recombinantes faz com que as vacinas de subunidade que utilizam esses antígenos recebam grandes investimentos e despertem interesses tanto pela segurança de uso como retorno financeiro (Diniz & Ferreira, 2010). A primeira vacina recombinante aprovada para uso humano foi a vacina da hepatite B (HBsAg) onde foi expresso e purificado um antígeno de superfície do vírus, em levedura. Há também para uso humano a vacina preventiva para infecções com vírus do papiloma humano (HPV) (Diniz & Ferreira, 2010).

A primeira vacina veterinária recombinante disponibilizada comercialmente foi produzida contra o vírus da leucemia felina (FeLV), sendo a proteína do envelope do FeLV, gp70, expressa em *Escherichia coli* (Figueiredo & Araújo Jr, 2011).

As vacinas com proteínas recombinantes podem ser desenvolvidas de diversas maneiras, dependendo do antígeno e do tipo de resposta imune que se deseja desencadear contra ele (Nascimento & Leite, 2012). Além disso, as vacinas recombinantes permitem diversas vias de administração, por exemplo, a vacinação oral para combate da raiva em cães de rua (Dietzschold et al. 2004; Antunes et al. 2012). A vacina Recombitek C6/CV (V8), utiliza as vias subcutânea (SC) ou intramuscular (IM) para cães contra cinomose (antígeno recombinante), hepatite, adenovírus tipo 2, parvovirose, parainfluenza, coronavirose, *Leptospira canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, isenta de adjuvante (Boehringer Ingelheim).

O gene para OspA, lipoproteína imunodominante da superfície externa da *Borrelia burgdorferi*, também foi clonado em *E. coli* e usado para confecção de uma vacina recombinante, com adjuvante, contra o agente da doença de Lyme (Guarino et al. 2017).

A Gavac™ é uma vacina comercial recombinante, que contém o antígeno Bm86 (rBM86) expresso na levedura *Pichia pastoris*, para ser usada em bovinos no combate ao carrapato (Rodriguez et al. 1994; Cunha et al. 2011).

O ProteqFlu-Te é uma vacina recombinante para utilização em cavalos que contém duas estipes de influenza equina (gripe) e o toxoide do tétano (Ford, 2009).

As vacinas recombinantes podem também funcionar como vacinas marcadoras, ou seja, podem ser usadas em conjunto com um teste diagnóstico que permite diferenciar o animal vacinado do animal que entrou em contato com o patógeno. Fundamentalmente, o que distingue uma vacina recombinante das convencionais (vírus morto e inativado) é a habilidade da vacina recombinante em induzir uma resposta protetora utilizando apenas frações selecionadas do vírus ou bactéria patogênica (Ford, 2009).

No entanto, o número crescente de vacinas produzidas com proteínas recombinantes, fracamente imunogênicas, desprovidas de sinais capazes de ativar a imunidade inata requer a adição de adjuvantes. Os adjuvantes superam essa insuficiência e aumentam a imunogenicidade do antígeno (Seubert et al. 2008).

Neste estudo foram usadas duas proteínas recombinantes para a confecção das vacinas utilizando a emulsão adjuvante de polissacarídeo bacteriano: Equi Merozoíto Antígeno recombinante (rEMA-2) de *Theileria equi* (Vianna et al. 2014); Toxina Épsilon recombinante (rETX) de *Clostridium perfringens* (Moreira et al. 2016).

3 HIPÓTESE E OBJETIVO

3.1 Hipótese: A emulsão composta de goma xantana, emulsificada com diferentes antígenos, possui função adjuvante vacinal.

3.2 Objetivo geral: Avaliar a eficiência imunogênica de emulsões adjuvantes constituídas de polissacarídeo bacteriano frente a antígenos recombinantes.

3.3 Objetivos específicos:

- Desenvolver formulações de emulsões compostas de polissacarídeo bacteriano;
- Avaliar a resposta imune humoral de camundongos vacinados com antígeno emulsificado com polissacarídeo bacteriano;
- Avaliar a resposta imune humoral de equinos vacinados com antígeno emulsificado com polissacarídeo bacteriano;
- Avaliar a resposta imune humoral e a produção de citocinas por leucócitos periféricos de bovinos vacinados com antígeno emulsificado com polissacarídeo bacteriano.

4 CAPÍTULOS

4.1 Emulsão adjuvante

Adjuvantes são moléculas que em combinação com antígenos, aumentam a resposta imunológica. Facilitam o reconhecimento do antígeno, o que, por sua vez, permite o desencadeamento de respostas imunes inatas e adaptativas (Guimarães et al. 2015).

O princípio básico das vacinas é induzir uma resposta imune que se assemelhe àquela induzida por infecções reais, evitando os efeitos colaterais indesejados da doença. O resultado desejado da vacinação ou infecção é imunidade, ou seja, a indução de memória imunológica (Seubert et al. 2008). Um número crescente de vacinas é produzido utilizando proteínas recombinantes, purificadas, que são pouco imunogênicas. Para superar este inconveniente, adjuvantes são adicionados às formulações de vacinas. Entretanto, para a escolha do adjuvante mais adequado é indispensável identificar as células alvo e os efeitos que esses exercem sobre elas (Seubert et al. 2008).

Os antígenos podem ser rapidamente metabolizados ou degradados ao serem administrados no organismo e não chegam ao local de ação desejado. Adjuvantes sob a forma de emulsões podem superar essas limitações protegendo o antígeno da degradação ou aumentando sua permeabilidade através das membranas (Melo et al. 2012).

Os sistemas de emulsões múltiplas, na maioria dos casos, são preparados em duas etapas. A primeira delas consiste na elaboração de uma emulsão primária A/O ou O/A, utilizando um emulsionante lipofílico. A segunda opera a reemulsificação da emulsão primária, pela adição à outra fase aquosa ou oleosa contendo tensoativos hidrofílicos ou lipofílicos, respectivamente, formando emulsões múltiplas do tipo A/O/A ou O/A/O (Dickinson, 2012). O polissacarídeo goma xantana é uma alternativa em potencial para utilização como adjuvante vacinal. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação adjuvante de uma emulsão tripla A/O/A composta por goma xantana, na qual 40% do antígeno são adicionados à fase interna da emulsão e 60 % do antígeno adicionados à fase externa da emulsão.

4.1.1 Material e Métodos

Polissacarídeo Bacteriano: A emulsão adjuvante foi preparada com o PSB, goma xantana, obtido comercialmente, marca Deosen Biochemical (lote do fabricante: 31150007 – data de fabricação: 02/01/2015).

Testes de Pureza:

Teste do iodo: Foi realizado o teste do iodo para verificar a pureza da goma xantana em relação à presença de amido – Foram colocados 2 mL de solução de polissacarídeo 1% em um tubo de ensaio; após foram adicionadas 2 gotas de solução de lugol 5% - Ultrafarma (Teste do iodo, 2017).

Pesquisa de micro-organismos: Para verificar a pureza da goma xantana com relação aos micro-organismos e possíveis contaminações procedeu-se como a seguir: Inoculação da solução de PSB em placas de Petri contendo os meios ágar-sangue (ágar com 5% de sangue de ovino desfibrinado) e YPD- ágar (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2% e água destilada q.s.p. 100 mL).

Solução aquosa do PSB: Para a formulação da emulsão foram testadas concentrações de PSB 0,2%, 0,3%, 0,4% e 0,5%, forma na qual o PSB foi adicionado à emulsão adjuvante, como a seguir: Após dissolução do PSB em água destilada, a solução foi mantida em agitador magnético (Q-241-2- Quimis aparelhos científicos LTDA) a 150 rpm por 1 h à temperatura de 28 °C. As soluções foram mantidas por 30 min em banho-maria a 90 °C para completa dissolução da goma conforme Khouryeh et al. (2005) e Altay & Gunasekaran (2006). Após, foram esterilizadas (121 °C por 20 min, autoclave) ou não esterilizadas.

Para o preparo da emulsão adjuvante diferentes fórmulas foram testadas, levando-se em conta estabilidade, viscosidade e possibilidade de incorporação da proteína de interesse.

Preparo da emulsão de PSB: A emulsão foi preparada em duas etapas: Na primeira etapa preparamos uma emulsão do tipo A/O (água/óleo): Fase 1 (aquosa) solução de PSB a 0,4%, glicerol (solubilizante hidrossolúvel); Fase 2 (oleosa) Montanide ISA 50 V2, Span® 80 (surfactante não iônico - lipofílico, origina emulsões

do tipo A/O) (Schneider, 2001). A fase 1 foi aquecida em uma chapa aquecedora (Warmnest 78HW-1 Constant temperature magnetic stirrer) a 40 °C e vertida sob agitação manual sobre a fase 2 aquecida a 60 °C até formação de emulsão A/O (emulsão primária) e completo resfriamento; Fase 3 (aquosa) solução de PSB a 0,2%, Tween® 80 (surfactante não iônico – hidrofílico, origina emulsões do tipo O/A) e o propilenoglicol (estabilizante de emulsões) (Schneider, 2001). A emulsão primária foi aquecida a 40 °C e vertida sobre a fase 3 (40 °C) sob agitação manual lenta, até formação da emulsão A/O/A e completo resfriamento (Dickinson, 2012).

Preparo das vacinas:

Para dose vacinal de 2 mL: Preparou-se 0,5 mL da fase 1 (aquosa) - com 40% da concentração total do antígeno;

Preparou-se 0,5 mL da fase 2 (oleosa);

Verteu-se a fase 1 na fase 2 sob agitação; Obteve-se uma emulsão A/O;

Preparou-se 1,0 mL da fase 3 (aquosa) – com 60% da concentração total do antígeno;

Verteu-se a emulsão A/O na fase 3 sob agitação – Obteve-se a emulsão A/O/A (Figura 1).

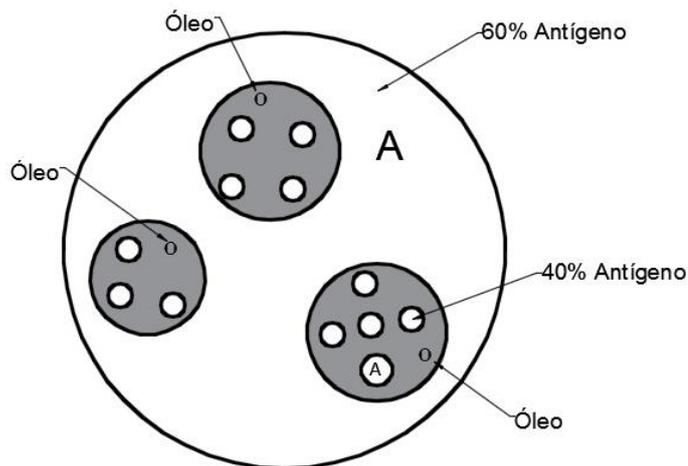


Figura 1. Representação esquemática das estruturas da emulsão tripla A/O/A; **A**: fase aquosa; **O**: fase oleosa. 40% do antígeno adicionados à fase interna da emulsão e 60 % do antígeno adicionados à fase externa da emulsão. Adaptado de: Pereira & Garcia-Rojas, 2015.

Avaliação macroscópica: Para a avaliação macroscópica da emulsão foram observados os parâmetros organolépticos: cor, odor e aspecto. Assim como, alterações: separação de fases, precipitação e turvação (Figueiredo et al. 2014).

Testes de estabilidade: Para avaliar a estabilidade da emulsão foram empregadas condições de armazenagem tais como: temperatura (elevada, ambiente e baixa), exposição à luz e ciclos de congelamento e descongelamento. A temperatura ambiente foi monitorada, sendo aceita variação de até ± 2 °C. A temperatura elevada foi monitorada em estufas a 37 °C (Isaac et al. 2008) sendo aceita variação de até ± 2 °C. Os limites de temperaturas baixas mais utilizadas foram em geladeira a 4 °C e em freezer de -20 °C (ANVS, 2007; Isaac et al. 2008; Figueiredo et al. 2014).

Teste de inocuidade: Para avaliação da inocuidade foram inoculadas 150 μ L da emulsão adjuvante em 3 camundongos por via SC e 2 mL da emulsão adjuvante em 3 equinos e 3 bovinos por via IM. Os animais foram monitorados por 7 dias para observar se não havia reação no local da aplicação da emulsão adjuvante (MAPA, 1998).

Análises reológicas: As emulsões de polissacarídeo, sem a adição das proteínas, e as soluções aquosas em diferentes concentrações foram analisadas pelo Laboratório de biopolímeros, Biotecnologia, CDTec para análises de viscosidade em Reômetro Haake Rheostress RS 150, controlador de temperatura Haake DC 50. A viscosidade foi medida na taxa de cisalhamento variando de 0,01 a 500 s^{-1} , temperatura de 25 °C (Diaz et al. 2004): AV 0,3% xantana - solução aquosa com xantana a 0,3%; AV emulsão 1 - emulsão de xantana autoclavada a 121 °C por 20 min; AV emulsão 2 – emulsão de xantana aquecida a 90 °C por 1h; AV emulsão – emulsão manipulada com soluções de xantana 0,5%, aquecida a 90 °C por 1h; AV 0,5% xantana - solução aquosa com xantana a 0,5%.

Teste de seringabilidade: Os testes de seringabilidade são importantes para verificar a penetração do ativo no animal e também a força despendida para empurrar o êmbolo com as amostras contidas na seringa (Lazzari et al. 2017). Verificou-se a seringabilidade da emulsão utilizando-se de uma seringa de 5 mL

(volume testado 2 mL) com agulha 25 x 8 mm para vacinarmos equinos e bovinos e seringa de 1 mL (volume testado 150 μ L) com agulha 13 x 0,45 mm para os camundongos.

4.1.2 Resultados

Segundo os testes feitos para presença de amido e crescimento de micro-organismos, a amostra de PSB comercial (goma xantana) mostrou-se pura: no teste com o iodo a solução de polissacarídeo não apresentou mudança de coloração (para azul), o que descartou a adulteração do produto com amido. Também não houve crescimento bacteriano e nem fúngico nos cultivos testados confirmando os dados de análise enviados pelo fornecedor (Vide anexo).

Após completa solubilização da amostra por 30 min a 90 °C (Khouryeh et al. 2005) não foi observado alteração da viscosidade das soluções com o polissacarídeo em nenhuma das concentrações usadas.

As emulsões mantiveram-se estáveis por 4 meses à temperatura ambiente e 6 meses à temperatura de refrigeração (4 °C). Foram consideradas estáveis as amostras que se mantiveram com aparência homogênea, sem que houvesse a separação das fases. Não sofreram alterações de cor ou odor quando expostas a luz, mas houve separação das fases quando submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento.

Teste de inocuidade: Não foram verificadas reações adversas (febre, granulomas, cistos) oriundas da aplicação da emulsão adjuvante nos animais, camundongos, equinos e bovinos por um período de sete dias após a aplicação.

Teste de seringabilidade: Na prova de seringabilidade a emulsão adjuvante se mostrou adequada para aplicação SC (camundongos) IM (equinos e bovinos).

Os resultados da reometria mostraram que a emulsão que apresentou a viscosidade mais alta foi a amostra AV emulsão 1 - manipulada com as soluções de xantana autoclavadas (Figura 2).

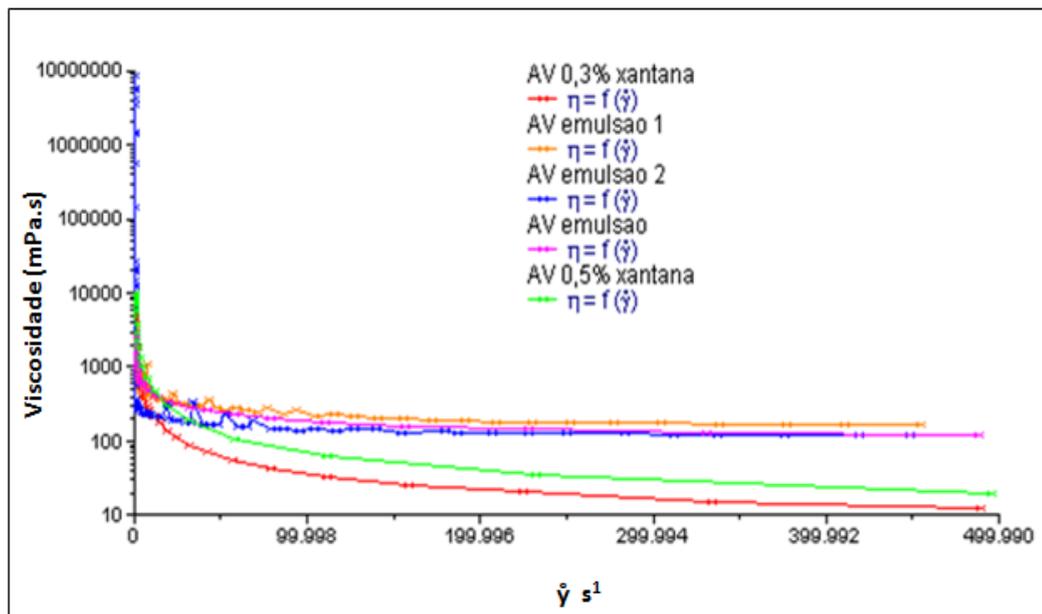


Figura 2. Curva de Viscosidade. AV 0,3% xantana – solução aquosa 0,3%; AV emulsão 1 – autoclavada a 121 °C por 20 min; AV emulsão 2 – aquecida a 90 °C por 1h; AV emulsão – aquecida a 90 °C por 1h, manipulada com as soluções de xantana a 0,5%; AV 0,5% xantana - solução aquosa 0,5%.

4.1.3 Discussão

No desenvolvimento de novos adjuvantes, questões como o custo, a facilidade e o tempo de produção devem ser avaliadas. Deve-se determinar também a facilidade de aplicação, possíveis reações adversas oriundas de sua aplicação e a capacidade de estimulação do sistema imune. A fórmula da emulsão desenvolvida nos proporcionou flexibilidade para adequação com diferentes antígenos.

Uma emulsão precisa de uma combinação adequada de ingredientes para atingir estabilidade cinética (Franzol & Rezende, 2015). O processo de fabricação foi otimizado obtendo-se a concentração ideal da goma xantana em cada uma das fases da emulsão para manter a estabilidade do sistema. Outro fator importante foi a escolha e a quantidade dos emulsificantes e dos estabilizadores adequados para cada uma das fases da emulsão. Usou-se na fase 2 (oleosa) um surfactante não iônico – lipofílico Span® 80; na fase 3 (aquosa) um surfactante não iônico – hidrofílico Tween® 80, e o propilenoglicol para dar estabilidade à emulsão (Schneider, 2001). A escolha dos emulsificantes e estabilizador corrobora os estudos de Franzol & Rezende (2015), que mostraram o quanto são importantes as

características químicas desses produtos para a obtenção de sistemas cineticamente estáveis. A estabilidade foi avaliada por observação do tempo que esta se manteve estável, isto é, sem que houvesse separação das fases.

A emulsão adjuvante não sofreu alteração de cor ou odor quando exposta à luz durante o período testado, conforme a legislação (Brasil, 2004) que diz que a cor e odor devem permanecer estáveis por no mínimo 15 dias à luz solar. Quanto ao aspecto, o produto deve permanecer íntegro durante todo o tempo de teste mantendo seu aspecto inicial exceto sob temperaturas elevadas ($\geq 37\text{ }^{\circ}\text{C}$) ou freezer ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Brasil, 2004), o que foi observado na emulsão desenvolvida.

A viscosidade da xantana é influenciada pela concentração de piruvato (Borges & Vendruscolo, 2008). Xantanas com conteúdo de piruvato $> 4\%$ apresentaram viscosidade superior àquelas com conteúdo de piruvato entre 0,5 a 3% (Borges & Vendruscolo, 2008). O conteúdo de piruvato do biopolímero (goma xantana) usado nesse estudo foi de 3,40%, o que está dentro da média descrita por outros pesquisadores como Luvielmo & Scamparini (2009) e Oliveira et al. (2013). Estes dados demonstraram a qualidade reológica do polissacarídeo, uma vez que o conteúdo de piruvato juntamente com a composição química são os indicadores dessa qualidade (Souza & Vendruscolo, 1999).

A emulsão adjuvante manipulada com soluções aquosas de goma xantana autoclavadas ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min) apresentou a mais alta viscosidade quando comparada as outras preparações. Estes resultados contrariam os trabalhos de Luvielmo & Scamparini (2009) que relataram que a viscosidade das soluções de goma xantana praticamente não se altera com a temperatura entre 4 e $93\text{ }^{\circ}\text{C}$, mas após a esterilização a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min 10% da viscosidade é perdida em produtos que contêm a goma xantana.

A viscosidade das soluções com goma xantana também se mantêm inalterada em pH entre 1 e 13 (Bueno & Garcia Cruz, 2001; Malferi Filho, 2001) e é pouco alterada na presença de sais (Luvielmo & Scamparini, 2009). No presente estudo verificamos que a concentração das proteínas pode influenciar a estabilidade da emulsão. Para atingirmos a concentração de antígeno requerida para a formulação da vacina, o volume da fase aquosa teve que ser aumentado quando a proteína encontrava-se diluída (concentração menor que $300\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) e conseqüentemente o volume da fase oleosa era diminuído, desestabilizado a emulsão (Schneider, 2001).

A emulsão adjuvante desenvolvida manteve-se estável pela escolha dos componentes utilizados e possivelmente pela dispersão do tamanho das gotas (O'Hagan, 2000). A viscosidade da fase externa, contendo a goma xantana e a tecnologia desenvolvida na fabricação também foram fatores importantes para manter a estabilidade da emulsão, uma vez que não foi observada separação das fases da mesma durante todo o período e condições testadas. O tempo de estabilidade observado (6 meses a 4 °C) foi considerado excelente, uma vez que as emulsões múltiplas possuem baixa estabilidade termodinâmica (Pereira & Garcia-Rojas, 2015).

O armazenamento por longos períodos faz com que ocorram mudanças em suas estruturas o que pode ocasionar perdas de bioativos nela emulsionados (Pereira & Garcia-Rojas, 2015). Observamos que a emulsão adjuvante desenvolvida não sofreu alterações na sua estabilidade no período estudado. O que sugere que fatores extrínsecos (acondicionamento, luz, umidade, micro-organismos) e fatores intrínsecos (pH, interações entre os componentes da formulação e oxidação de seus componentes) não alteraram sua estabilidade (Brasil, 2004).

Uma emulsão múltipla possui, devido as suas características estruturais, potencial para transporte e liberação controlada de componentes bioativos e encapsulados. Pode, também, proteger essas substâncias da oxidação e da ação de enzimas (Pereira & Garcia-Rojas, 2015). A liberação controlada de componentes da fase contínua interna da emulsão para a fase contínua externa tem sido demonstrada em diversas pesquisas da área médica e farmacêutica (Pereira & Garcia-Rojas, 2015). Baseado nestes conceitos, desenvolvemos um adjuvante vacinal sob a forma de uma emulsão tripla, uma vez que essas emulsões podem ser úteis como transportadores e liberadores de antígeno vacinais, bem como, ativadores do sistema imune. Takeuchi et al. (2009) e Schuch et al. (2017) reportaram que a goma xantana possuía ação adjuvante e sugeriram que era reconhecida pelo sistema imune inato através de receptores tipo TLR-4. E que a sinalização via TLR-4 ocorria pela ativação do fator de transcrição NF- κ B induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias responsáveis pela modulação da resposta imune inata e adquirida (Pasare & Medzhitov, 2005).

Na fase oleosa da emulsão adjuvante múltipla A/O/A usamos o adjuvante Montanide ISA 50 V2 (SEPPIC) para emulsões A/O estáveis, com baixa viscosidade. Esse adjuvante pode estimular respostas imunes tanto humorais como mediadas por

células e ser eficiente para obtenção de resposta imune em longo prazo (Resende et al. 2004; Coffman et al. 2010).

Óleos minerais e vegetais também foram testados na produção da emulsão (dados não mostrados). Sabe-se, entretanto, que os adjuvantes baseados em óleos minerais são muito eficientes, mas podem induzir reações locais e não são biodegradáveis (Mota et al. 2006; Mohan et al. 2013). Óleos vegetais são bem tolerados, mas menos eficientes adjuvantes imunológicos (Aucouturier et al. 2001). Com ambos, óleo mineral e óleo vegetal, obteve-se emulsões muito viscosas que não foram adequadas na prova de seringabilidade (dados não mostrados). A estabilidade da emulsão também não se manteve, o que pode ter ocorrido devido a alta viscosidade desses óleos e a não adaptação com os emulsificantes ou com a concentração da goma xantana utilizada (Schneider, 2001).

4.1.4 Conclusão

A emulsão adjuvante A/O/A formulada com o polissacarídeo bacteriano associado ao óleo Montanide™, foi inócua, apresentou seringabilidade e manteve-se estável nas condições de avaliação, sugerindo ser um promissor adjuvante vacinal.

4.2 *Theileria equi*

O protozoário intracelular, *Theileria equi* é o causador da theileriose equina. Piroplasmose considerada de grande importância em equinos, transmitida por carrapatos em regiões tropicais e subtropicais (Schein, 1988; Alanazi et al. 2014). A transmissão de *T. equi* ocorre no repasto do carrapato, inoculando suas formas infectantes (esporozoítos) (Uilenberg, 2006). *Theileria equi* exibe um ciclo bifásico no hospedeiro mamífero com uma fase de desenvolvimento intra leucocitário seguido por uma fase intra-eritrocitária (Ramsay et al. 2013). A fase intra leucocitária inclui infecção de linfócitos B e T, monócitos e macrófagos.

Infecções por *T. equi* caracterizam-se pelo desenvolvimento de anemia hemolítica progressiva nos animais infectados, sendo a patogenia da enfermidade determinada principalmente pela lise de eritrócitos durante a invasão e multiplicação do parasito (Knowles et al. 1994; Lording, 2008). Os sinais clínicos variam de quadro assintomático a agudo. Neste último, os animais apresentam febre, anemia, hemoglobinúria, edema, dispneia, perda do desempenho atlético, aborto e até óbito (Zobba et al. 2008; Roncati et al. 2011). Nos casos crônicos e sub crônicos, mesmo com aparência saudável, equinos podem portar o parasito em seu sangue por muitos anos e são eles, juntamente com os vetores, os responsáveis pela manutenção da infecção (Schein, 1988; Bahrami et al. 2014).

Theileria equi expressa proteínas de superfície, equi merozoítos antígenos (EMA-1, EMA-2, EMA-3 e EMA-6) que desempenham um papel importante na patogênese e apresentam-se como alvos imunológicos ao hospedeiro parasitado (Knowles et al. 1991; 1992; Silva et al. 2013). EMA-1 (34 kDa) e EMA-2 (30 kDa) foram descritos como antígenos imunodominantes expressos na superfície de merozoítos que desempenham um papel na interação com o citoesqueleto de eritrócitos (Knowles et al. 1991, 1992; Kappmeyer et al. 1993, 2012). A proteína EMA-2 surge como um antígeno promissor para uso em vacina contra a theileriose equina por dois motivos: EMA-2 não apresenta diversidade genética, sugerindo que ela seja conservada em todo o mundo (Kumar et al. 2013, Vianna et al. 2014); EMA-2 está presente no citoplasma e na membrana do eritrócito, sugerindo ser um dos primeiros antígenos a serem reconhecidos pelo sistema imune (Kumar et al. 2004).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito adjuvante de uma emulsão tripla em uma vacina experimental contendo a proteína recombinante EMA-2 de *T. equi*.

4.2.1 Material e Métodos

Proteína recombinante EMA-2:

A proteína EMA-2 (*Equi Merozoite Antigen – 2*) do protozoário *T. equi* foi expressa na levedura *Pichia pastoris* (Vianna et al. 2014) e foi usada como antígeno em uma vacina para theileriose equina associada com a emulsão tripla adjuvante desenvolvida com o polissacarídeo bacteriano, goma xantana, e usando na sua fase oleosa o Montanide ISA 50 V2 (SEPPIC). Brevemente, a emulsão foi preparada em duas etapas: Na primeira etapa preparou-se uma emulsão do tipo A/O (água/óleo) contendo solução de PSB a 0,4% e 40% do antígeno; na fase oleosa, o Montanide ISA 50 V2. Na segunda etapa foi preparada a emulsão A/O/A usando-se na fase externa solução aquosa de PSB a 0,2% e 60% do antígeno. A emulsão A/O foi aquecida a 40 °C e vertida sobre a fase externa, também aquecida a 40 °C, sob agitação, até formação da emulsão A/O/A.

Vacinação dos camundongos:

Após aprovação pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL - CEEA: 9339) 20 camundongos fêmeas, BALB/c de 6 a 8 semanas foram divididos em 4 grupos com 5 animais cada e vacinados por via subcutânea com 150 µL de inóculo:

Grupo 1 – Tris HCl estéril (pH=7,4) + proteína rEMA-2, 50 µg por dose; Grupo 2 – PSB (AV 0,5% xantana) + proteína rEMA-2, 50 µg por dose; Grupo 3 – Emulsão adjuvante + proteína rEMA-2, 50 µg por dose; Grupo 4* – Emulsão adjuvante + proteína rEMA-2, 50 µg por dose. O grupo 4 recebeu a mesma composição vacinal do grupo 3, mas foi vacinado apenas 1 vez no dia 0.

Os animais foram vacinados nos dias 0 e 21. Amostras de sangue foram coletadas por via submandibular nos dias 0, 14, 28, 42 e 60.

Dinâmica da resposta de IgG sérica em camundongos:

O ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) foi realizado de acordo com Vianna et al. (2014) com modificações. Brevemente, o antígeno rEMA-2 foi aplicado às placas de Poliestireno (Nunc™- Placa imuno Polysorp–96 orifícios) na concentração de 200 ng por poço, diluído em tampão carbonato bicarbonato pH 9,6 por 18 h a 4 °C. Após três lavagens os controles positivo e negativo e os soros testados foram diluídos 1:50 em PBS-T e adicionados 100 µL por poço, em duplicata. Foram incubados a 37 °C por 60 min e, após três lavagens, foi adicionado o anticorpo anti camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich), diluído 1:4000; a placa foi incubada a 37 °C durante 90 min. Após lavagem, o cromógeno/substrato tampão citrato/fosfato (TPS) foi adicionado e a placa mantida 15 min no escuro. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de H₂SO₄ 1N. As absorbâncias foram medidas no leitor de microplacas (TP-READER – Thermo Plate), utilizando 492 nm de comprimento de onda.

Os isotipos IgG1 e IgG2a foram avaliados por ELISA usando “pool” por grupo dos soros coletados nos dias 28 e 60. As placas foram sensibilizadas como descrito para o ELISA de rEMA-2 acima. Os soros foram adicionados em triplicata às placas, 100 µL/poço do “pool” dos soros diluídos 1:50 em PBS-T e incubadas a 37 °C durante 60 min. Após este período, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e após foi adicionado 100 µL do anticorpo anti camundongo IgG1(produzido em cabra) diluído 1:2000 (Sigma Aldrich). A placa foi incubada a 37 °C durante 30 min e as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e após foi adicionado 100 µL do anticorpo anti cabra conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído 1:4000. Após lavagem, foi adicionado o cromógeno/substrato tampão citrato/fosfato (TPS) e a placa mantida 15 min no escuro. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de H₂SO₄ 1N. As absorbâncias foram medidas no leitor de microplacas (TP-READER – Thermo Plate), utilizando 492 nm de comprimento de onda. O mesmo protocolo foi realizado utilizando anticorpo anti-isotipo IgG2a de camundongo.

Vacinação dos equinos:

Após aprovação pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL- CEEA: 9339) 12 equinos da raça crioula, criados a campo, pertencentes ao Hospital Veterinário da UFPel, foram divididos em 4 grupos experimentais, cada qual com 3 animais e inoculados por via intramuscular (IM) no dia 0 e 21. Os grupos foram classificados pelos números de 1-4 e receberam os seguintes tratamentos:

Grupo 1 – Grupo controle - Os animais foram vacinados com a proteína rEMA-2, 200 µg por dose de 2 mL + Tris HCl estéril (pH=7,4); Grupo 2 – Os animais foram vacinados com PSB (AV 0,5% xantana) + proteína rEMA-2, 200 µg por dose de 2 mL; Grupo 3 – Os animais foram vacinados com a emulsão adjuvante + proteína rEMA-2, 200 µg por dose de 2 mL; Grupo 4 – Os animais foram vacinados com 10% de hidróxido de alumínio Alhydrogel® (Brenntag Nordic, Haslev, Denmark) (Al (OH)₃) + proteína rEMA-2, 200 µg por dose de 2 mL.

As amostras de soro foram coletadas nos dias 0, 14, 21, 35 e 65 e 85 e o soro coletado foi armazenado a -20 °C até seu uso.

Dinâmica da resposta de IgG sérica em equinos:

O título de anticorpos sistêmicos foi determinado através de ELISA utilizando como antígeno a proteína rEMA-2 como descrito acima com modificações: o soro de equinos testado foi diluído 1:100 em PBS-T; o anticorpo anti-equino conjugado com peroxidase (Sigma- Aldrich) foi diluído 1:6000.

Titulação:

A titulação foi realizada com soros da coleta do dia 35 fazendo-se um “pool” dos soros de cada um dos grupos, diluídos na base 2, por ELISA, com 200 ng de rEMA-2 por poço. Iniciou-se na diluição 1:200 até 1:204.800 e foi estabelecida a diluição que os anticorpos anti-EMA-2 eram detectados.

Análise estatística:

O software comercial Statistix 8.0® foi utilizado para análise estatística. O teste Shapiro-Wilk foi usado para verificar a normalidade, seguido pela análise de distribuição de frequência. Os dados normalmente distribuídos foram comparados entre os grupos por ANOVA e teste de Tukey. A significância foi estabelecida em $p < 0,05$ e $p < 0,01$ para os testes. Os gráficos foram preparados usando o software comercial GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e Microsoft Excel 2010.

4.2.2 Resultados

Dinâmica da resposta de IgG sérica em camundongos

A avaliação da resposta humoral em camundongos com a proteína rEMA-2, utilizando a emulsão com o polissacarídeo bacteriano como adjuvante é apresentada na figura 3. O título de anticorpos manteve-se aumentando até os 60 dias de coleta. No dia 28 os grupos 3 (emulsão adjuvante + rEMA-2- 2 doses da vacina) e 4 (emulsão adjuvante + rEMA-2- 1 dose da vacina) não apresentaram diferença estatística entre si (0,192 e 0,221, respectivamente) no entanto, ambos foram diferentes estatisticamente ($p < 0,05$) ao grupo 1 (0,137), que foi inoculado apenas com a proteína sem adjuvante; o grupo 4 ainda apresentou diferença ($p < 0,05$) para o grupo 2 (PSB + rEMA-2). Com 42 dias os grupos 3 e 4 (0,246 e 0,232 respectivamente) apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) aos grupos 1 e 2 (0,145 e 0,156 respectivamente), mas não entre si. Com 60 dias os grupos 2, 3 e 4 (0,312, 0,385 e 0,326) não apresentaram diferença estatística quando comparados entre si, mas os três grupos mostraram-se diferentes estatisticamente ao grupo 1 (0,204) que não usou adjuvante ($p < 0,05$).

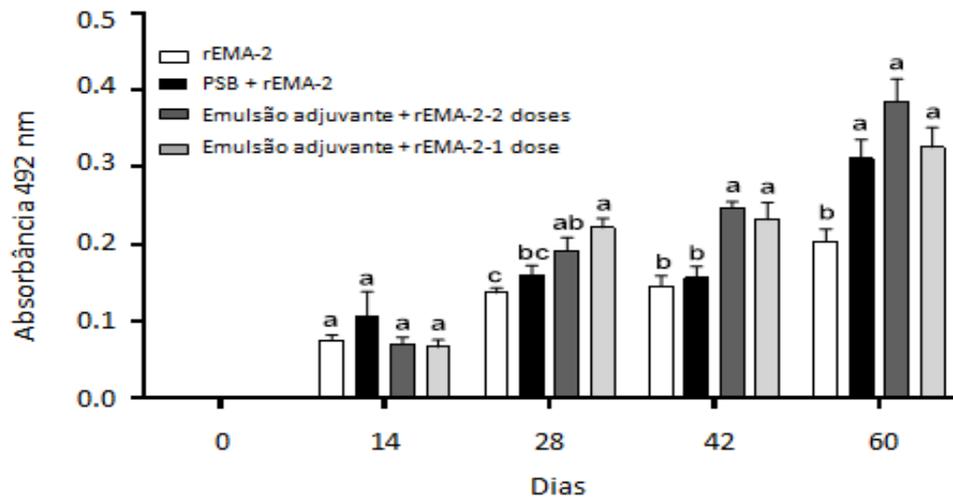


Figura 3. Níveis séricos totais de IgG por ELISA de camundongos vacinados com rEMA-2. Os dados representam a média (+/- desvio padrão) da leitura de absorvância (492 nm de comprimento de onda) dos soros dos camundongos vacinados com rEMA-2. As letras **a**, **b** e **c** representam diferença estatística de $p < 0,05$ entre os grupos nos dias 28, 42 e 60.

O perfil de isotipos IgG foi determinado nos dias 28 e 60 do experimento. A figura 4 mostra o perfil de isotipos de imunoglobulinas IgG1 e IgG2a. Todos os animais que receberam a emulsão adjuvante apresentaram significativamente maiores títulos de IgG1 e IgG2a quando comparados aos animais dos outros grupos ($p < 0,05$). Foi observada uma tendência de aumento dos níveis tanto IgG1 quanto de IgG2a do dia 28 para o dia 60 (Figura 4A e 4B).

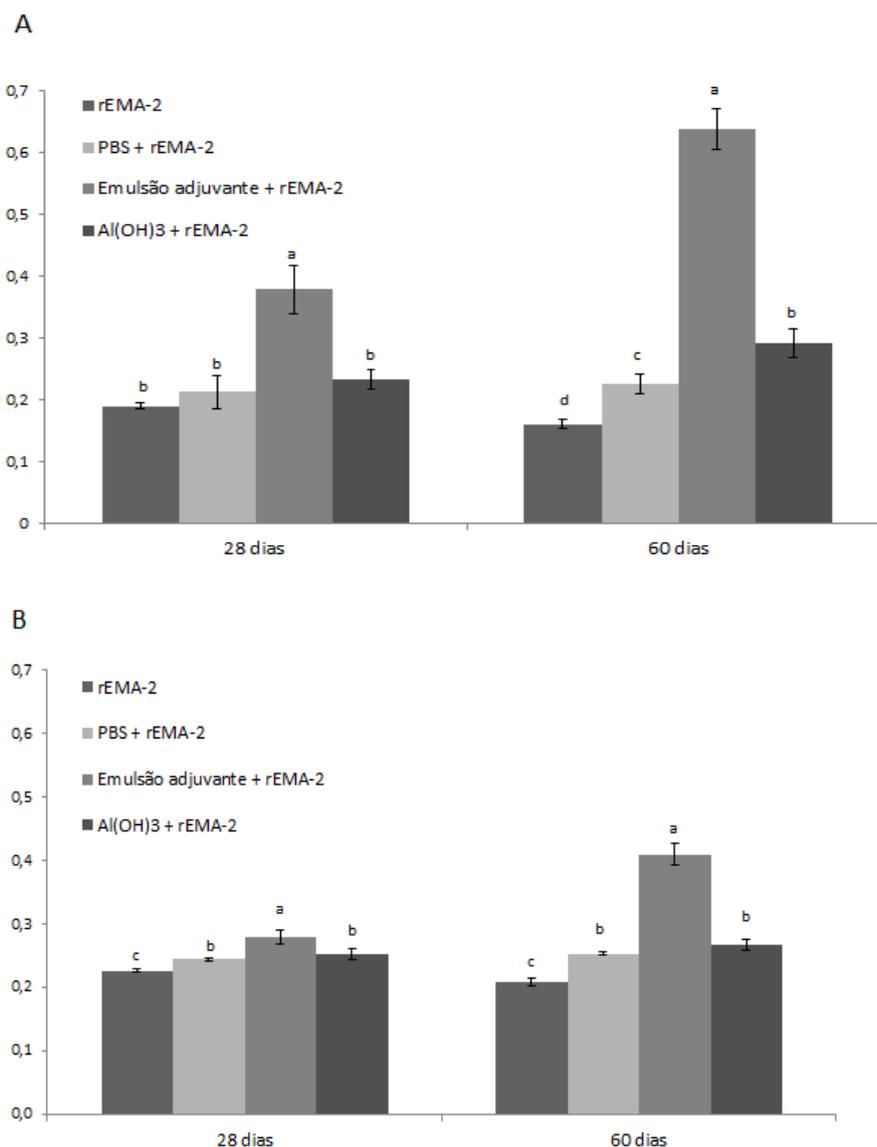


Figura 4. Perfil de isotipos de imunoglobulinas em camundongos vacinados com rEMA-2. Os dados representam as médias (\pm desvio padrão) dos valores de absorvâncias obtidas pelo ELISA indireto dos soros coletados dos animais nos dias 28 e 60 do experimento **(A)** Níveis de IgG1. **(B)** Níveis de IgG2a dos grupos experimentais. Diferentes letras, **a**, **b** e **c** significam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos nos dias 28 e no dia 60.

Dinâmica da resposta de IgG sérica em equinos

O soro de equinos vacinados com a proteína rEMA-2 com diferentes adjuvantes apresentou diferença significativa entre os grupos quando avaliado por ELISA indireto. No dia 14 o grupo 3 (emulsão adjuvante + rEMA-2) apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo 1 (rEMA-2), grupo 2

(PSB + rEMA-2) e grupo 4 (hidróxido de alumínio + rEMA-2) (0,365; 0,230; 0,234 e 0,254, respectivamente). No dia 35 o grupo 3 apresentou uma diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos 2 e 4 (0,661; 0,473 e 0,510, respectivamente). No dia 65 o grupo 3 apresentou uma diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos 2 e 4 (0,596; 0,339 e 0,353, respectivamente) e também no dia 85 (0,503; 0,313 e 0,319, respectivamente). Houve uma diferença significativa ($p < 0,01$) entre o grupo 3 e o grupo 1, no dia 35 (0,661 e 0,319, respectivamente), no dia 65 (0,596 e 0,130, respectivamente) e no dia 85 (0,503 e 0,103, respectivamente). Os grupos 2 e 4 obtiveram diferença estatística ($p < 0,05$) em comparação com o grupo que não usou adjuvante (grupo 1) no dia 35 (0,473; 0,510 e 0,319, respectivamente), no dia 65 (0,339; 0,353 e 0,130, respectivamente) e no dia 85 (0,313, 0,319 e 0,103, respectivamente) (Figura 5).

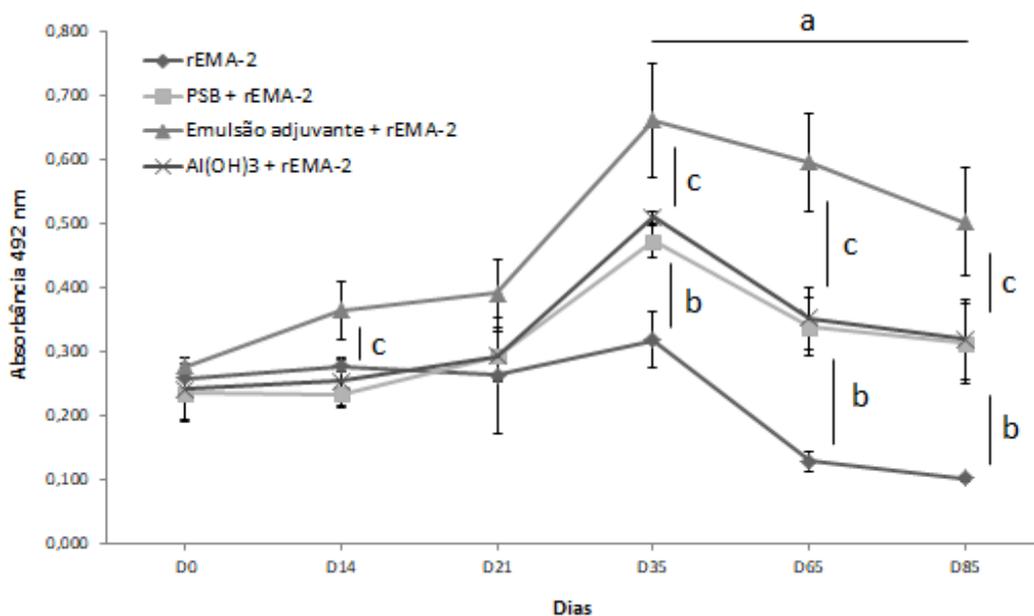


Figura 5. Níveis séricos totais de IgG por ELISA de equinos vacinados com rEMA-2. Os dados representam a média (+/- desvio padrão) da leitura de absorbância (492 nm de comprimento de onda) dos soros de 12 equinos vacinados com rEMA-2. Os animais foram inoculados no dia 0 e reforçados no dia 21. Os soros foram coletados nos dias 0, 14, 21, 35, 65 e 85. **(a)** representa diferença $p < 0,01$ entre o grupo emulsão adjuvante + rEMA-2 (grupo 3) e o grupo rEMA-2 (grupo 1); **(b)** representa diferença $p < 0,05$ entre os grupos PSB + rEMA-2 (grupo 2), Al(OH)₃ + rEM-2 (grupo 4) e o grupo rEMA-2 (grupo 1); **(c)** representa diferença $p < 0,05$ entre o grupo emulsão adjuvante + rEMA-2 (grupo 3) e os grupos PSB + rEMA-2 (grupo 2) e Al(OH)₃ + rEM-2 (grupo 4).

Titulação

Os soros da coleta do dia 35 foram titulados na base 2 até a diluição na qual os anticorpos anti-rEMA-2 não foram mais detectados. O título de anticorpos presente no soro dos animais em que vacinamos com a emulsão adjuvante + rEMA-2 foram detectados até a diluição 51.200, apresentando diluição média de 34.133 com significância estatística ($p < 0,05$) para os outros grupos (grupo 1, sem adjuvante; grupo 2, PSB como adjuvante e grupo 4, hidróxido de alumínio como adjuvante). Os grupos PSB + rEMA-2 e $\text{Al}(\text{OH})_3$ + rEMA-2 apresentaram anticorpos detectados até a diluição 12.800, apresentando média de diluição de 8.533, com significância estatística ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo que não recebeu o adjuvante, apenas a proteína rEMA-2, no qual só foram detectados anticorpos até a diluição 3.400 (média de 2.400) (Figura 6).

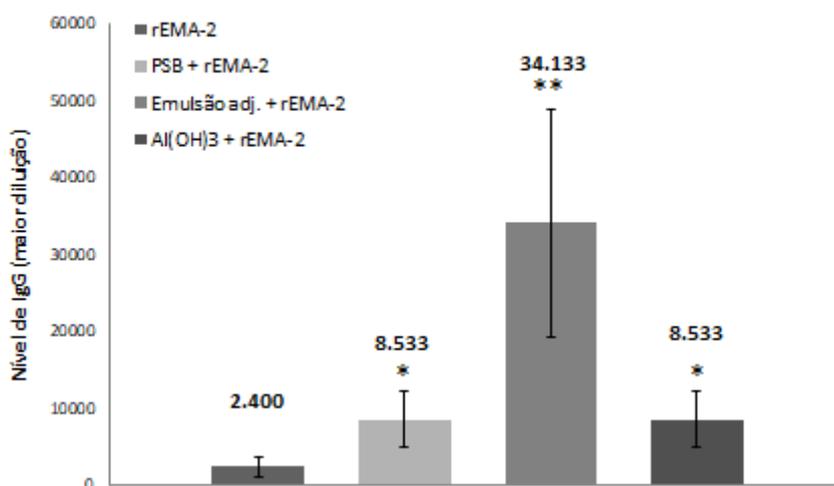


Figura 6. Titulação dos níveis totais de IgG em equinos vacinados com rEMA-2. Os dados representam a titulação média (+/- desvio padrão) dos soros de 12 equinos vacinados com rEMA-2 e coletados no dia 35. Os soros foram titulados de 1:200 a 1:102.400. O asterisco (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos PSB + rEMA-2, $\text{Al}(\text{OH})_3$ quando comparados ao grupo rEMA-2 (sem adjuvante). Os asteriscos (**) representam diferença estatística entre o grupo emulsão adjuvante + rEMA-2 e os outros três grupos testados ($p < 0,05$).

4.2.3 Discussão

As características no desenvolvimento da infecção por espécies de *Theileria* em seus hospedeiros mamíferos são importantes para o desenvolvimento de vacinas. Ao contrário de outros protozoários do subfilo Apicomplexa, que normalmente residem em vacúolos endocíticos, *Theileria* spp. desenvolve-se dentro do citoplasma das células hospedeiras (Fawcett et al. 1982). As formas infecciosas, esporozoítos, invadem o leucócito / eritrócito após a dissolução da membrana celular endossomal (Morrison & McKeever, 2006).

Atualmente, não há vacina disponível para a theileriose equina e as opções de tratamentos não têm sido efetivas (Bahrami et al. 2014; OIE, 2017). As limitações impostas pelo uso de parasitos vivos para a preparação de vacinas contra a theileriose, como dificuldades na padronização da composição antigênica e atenuação do parasito, levaram ao estudo do desenvolvimento de vacinas subunitárias empregando antígenos parasitários (Morrison & McKeever, 2006). Neste estudo, avaliamos uma vacina para theileriose equina utilizando a proteína recombinante EMA-2 (rEMA-2) de *Theileria equi* (Vianna et al. 2014) usando como adjuvante uma emulsão de polissacarídeo bacteriano, goma xantana.

A escolha do antígeno EMA-2 baseou-se em trabalhos anteriores que sugerem que os antígenos de superfície de *T. equi* (EMAs- *equi merozoite antigen*) sejam um dos primeiros antígenos a serem reconhecidos pelo sistema imunológico (Kumar et al. 2004; 2013) e já foram reconhecidos em monócitos/macrófagos (Ramsay et al. 2013). São também excelentes alvos na detecção de anticorpos contra este parasito (Kumar et al. 2004; Vianna et al. 2014).

Frequentemente os antígenos de subunidade apresentam fraca imunogenicidade e as vacinas precisam ser formuladas com adjuvantes para aumentar as respostas humoral e celular (Seubert et al. 2008; Pasquale et al. 2015). Sendo assim, neste estudo testou-se a emulsão adjuvante composta de PSB, goma xantana, para aumentar a capacidade imunogênica da proteína rEMA-2.

O antígeno rEMA-2 com a emulsão adjuvante foi testado em camundongos e equinos, animal alvo. Segundo Petrovsky e Cooper (2011) o estudo em animal alvo é importante, pois muitos efeitos adjuvantes, incluindo a potência, variam de espécie para espécie. Adjuvantes de alumínio são eficazes no aumento da resposta de

anticorpos contra influenza em camundongos, mas não tem o mesmo efeito quando testada em humanos (Keitel et al. 2008). Comparamos o aumento do título de anticorpos em equinos usando o hidróxido de alumínio como adjuvante, uma vez que este continua sendo largamente utilizado em vacinas veterinárias (Mota et al. 2006; Roos et al. 2009; Mirotti et al. 2017), como por exemplo, a vacina para prevenção em equinos de encefalomielite, rinopneumonite, influenza e tétano (Lexington-8 – Venco saúde animal).

No presente trabalho os grupos experimentais vacinados com a emulsão adjuvante, tanto dos camundongos, como dos equinos apresentaram níveis de IgG aumentados significativamente quando comparados aos grupos vacinados com outros adjuvantes. O uso de adjuvantes combinados tem sido uma alternativa eficaz para a estimulação e ligação da imunidade inata e adaptativa uma vez que sugerem serem capazes de estimular múltiplos receptores e diferentes vias de sinalização (Garg et al. 2017). A emulsão adjuvante avaliada neste estudo pode ser considerada uma emulsão combinada, uma vez que além do polissacarídeo bacteriano, goma xantana, contido em suas fases aquosas, contém o óleo Montanide™, ambos com capacidade adjuvante comprovada (Roos et al. 2009; Dummer et al. 2014; Schuch et al. 2017).

O título de anticorpos nos camundongos manteve-se aumentando até o dia 60 (último dia observado). No entanto após a segunda dose da vacina (dia 21) os dois grupos que receberam o antígeno adjuvado com a emulsão já apresentaram títulos de anticorpos significantes superiores em relação ao grupo que recebeu apenas o antígeno ($p < 0,05$). Este dado mostra a importância do adjuvante em vacinas com antígenos recombinantes que tendem a ser menos imunogênicas e necessitam de adjuvantes para intensificar e modular a resposta imune (Mota et al. 2006; Diniz & Ferreira, 2010). O título de anticorpos se manteve mais elevado no dia 42 nos grupos que receberam a emulsão adjuvante. No dia 60 o título de anticorpos dos grupos que utilizaram o PSB foi os mais elevados não apresentando diferença estatística entre eles. Estes resultados sugerem que o PSB foi a porção imunomoduladora da emulsão, pois sozinha ou associada ao óleo induziu níveis de anticorpos similares. Outro fato em favor do papel da xantana nesse resultado é a concentração de óleo utilizada na emulsão em relação a sua concentração quando utilizado isoladamente como adjuvante. Na emulsão sua participação é de menos de 10% V/V, enquanto que quando utilizado isoladamente chega a ser de 50% V/V.

Cabe especular também, que o efeito possa ser devido ao antígeno (rEMA-2), entretanto, esta observação ficou fora do escopo do presente estudo (Figura 3).

Outros trabalhos já demonstraram a ação adjuvante da goma xantana (Roos et al. 2009; Bacelo et al. 2014; Schuch et al. 2017), apesar dos antígenos serem outros e os protocolos de experimentação também serem distintos. Neste experimento com camundongos comprovou-se o papel potencial adjuvante da goma xantana.

Segundo Pellegrino et al. (2015) a resposta de anticorpos induzida por emulsões parece ter um perfil mais equilibrado de IgG1:IgG2a quando comparado ao hidróxido de alumínio. Na theileriose são importantes as respostas imunes celulares dirigidas a leucócitos parasitados, assim como, a indução de respostas de anticorpos capazes de neutralizar a infecciosidade de esporozoítos (Morrison & McKeever, 2006). A modulação da resposta imune mediada por adjuvantes neste estudo foi demonstrada também pelo perfil de isotipos de imunoglobulinas IgG1 e IgG2a. Nos dias 28 e 60 do experimento foram observados níveis significativos maiores de IgG1 nos animais que receberam a emulsão adjuvante (Figura 4A). No dia 60 observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de IgG2a no grupo vacinado com a emulsão adjuvante em relação ao dia 28 (Figura 4B). Esta observação, incremento nos níveis de IgG2a, sugere que ao passar do tempo há modulação da resposta com tendência a Th1. Entretanto, nos outros grupos esta tendência não foi observada.

Os equinos usados nesse experimento, por virem de áreas endêmicas para theileriose equina (sul do Brasil), já apresentavam títulos de anticorpos anti EMA-2 e foram agrupados de acordo com o nível desses títulos. No entanto, observamos um aumento significativo no título de anticorpos durante o experimento induzido pela vacina. O título de anticorpos dos equinos foi determinado após vacinação (ELISA) usando-se a proteína rEMA-2 de *Theileria equi* com diferentes adjuvantes. No dia 14 após vacinação o grupo que recebeu a emulsão adjuvante já apresentou diferença significativa no título de anticorpos ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos. Este dado sugere que em caso de surtos, a vacina com a emulsão adjuvante já irá proteger o rebanho equino mais rapidamente. O grupo que foi vacinado com a emulsão adjuvante apresentou nos dias 35, 65 e 85 níveis significativos mais altos de anticorpos quando comparado ao grupo que recebeu apenas a proteína recombinante sem o adjuvante. Esse aumento foi de até cinco vezes no dia 85 (Figura 5). Palmer & McElwain (1995) já propunham a utilização de adjuvantes

associados aos antígenos de superfície como forma de otimizar a estimulação imunológica específica, por meio da apresentação desses antígenos aos linfócitos. Nossos dados vêm corroborar aos reportados pelos autores acima mencionados.

Obteve-se ainda, aumento no título de anticorpos nos dias 35, 65 e 85 do grupo vacinado com a emulsão adjuvante quando comparado ao grupo que recebeu o hidróxido de alumínio e ao grupo que recebeu apenas o PSB (Figura 5). Os sais de alumínio como adjuvantes levam a um aumento da produção de anticorpos e, em geral, não são eficientes na prevenção de infecções por patógenos intracelulares (Pasquale et al. 2015), como a *T. equi*. Os mecanismos precisos da imunidade adaptativa para o controle da theileriose equina não são totalmente compreendidos, mas há evidências de que tanto respostas humorais quanto celulares estão envolvidas (Kumar et al. 2002; Mealey et al. 2012; Wise et al. 2013). Sugere-se que após a lise dos eritrócitos infectados com *T. equi* os parasitos tornam-se acessíveis aos anticorpos e aos mecanismos de proteção associados a estes: neutralização dos parasitos extracelulares, bloqueio da penetração celular e opsonização dos eritrócitos (Cunha et al. 2006).

Na titulação dos níveis de IgG total no dia 35 do experimento (Figura 6) foi observado que os animais que receberam a emulsão adjuvante apresentaram títulos significativos maiores do que os animais que receberam como adjuvante o hidróxido de alumínio e o PSB. Os dois grupos que receberam adjuvantes (hidróxido de alumínio e PSB) também mostraram títulos de IgG total significativos maiores do que o grupo que não recebeu o adjuvante, apenas a proteína. A inclusão de emulsões como adjuvante aumenta a capacidade antigênica dos níveis de anticorpos quando comparados ao hidróxido de alumínio (Pellegrino et al. 2015). Os resultados obtidos no presente experimento sugerem que tanto a fração de óleo utilizada na emulsão quanto a PSB ou a sua associação modularam a resposta imune. Os adjuvantes a base de óleo formam um depósito do antígeno no local de administração, atraindo células apresentadoras de antígenos (APC). Esse tipo de adjuvante é comumente associado a respostas imunes Th1 / Th2 mistas. No entanto, podemos especular, baseado nos dados obtidos em camundongos, onde a xantana sozinha ou na forma de emulsão induziu um aumento significativo do isotipo IgG2a, e foi a responsável na modulação da resposta para Th1 observada. Entretanto a isotipagem de IgG equina não foi realizada, desta forma não temos como afirmar que a xantana

modulou a resposta para Th1 em equinos como o observado no experimento com camundongos.

Os dados obtidos neste estudo sugerem que a emulsão tripla adjuvante usada junto com a proteína rEMA-2 ampliou os níveis de anticorpos nos dois animais testados, camundongos e equinos, abrindo perspectivas para seu potencial uso como adjuvante em vacinas de subunidade.

4.2.4 Conclusão

A emulsão tripla adjuvante contendo o polissacarídeo bacteriano, goma xantana, e o óleo Montanide foi capaz de incorporar a proteína rEMA-2, e demonstrou seu papel adjuvante intensificando a resposta imune sem causar efeitos adversos nos animais testados.

4.3 *Clostridium perfringens*

As clostridioses estão entre as principais enfermidades que acometem os animais domésticos, com altas taxas de morbidade e letalidade, acarretando grandes prejuízos econômicos ao setor produtivo. *Clostridium* spp. são bastonetes Gram-positivos, esporulados e anaeróbios estritos, sendo a maioria constituinte da microbiota intestinal. Dentre as toxinas de origem clostridial, destaca-se a toxina épsilon produzida por *C. perfringens* tipo B e D, como uma das mais potentes toxinas de origem microbiana conhecidas (Silva et al. 2015; Ferreira et al. 2016).

O *Clostridium perfringens* é uma bactéria comensal presente no trato gastrointestinal de humanos e animais saudáveis (Ferreira et al. 2016). Entretanto, é o agente causador de doenças histotóxicas e enterotóxicas em humanos e animais (Rood et al. 2018). Os toxinótipos B e D de *C. perfringens* produzem a toxina Épsilon (ETX) (Rocha et al. 2008; Yao et al. 2016). A ETX é sintetizada na forma de prototoxina, e é ativada quando seu resíduo terminal C-23 é clivado por proteases. Após a ativação no trato intestinal, esta prototoxina promove uma enterotoxemia fatal rápida em bovinos e outros animais, levando a importantes prejuízos econômicos (Rocha et al. 2008; Yao et al. 2016).

Para controlar essa doença, a vacinação representa a melhor abordagem. As vacinas comerciais disponíveis são polivalentes e baseadas em toxoide. No entanto, o processo pelo qual estes toxoides são produzidos pode acarretar perigo aos seus manipuladores, uma vez que o *C. perfringens* é patogênico para humanos (Moreira et al. 2016). Moreira et al. (2016) reduziram os problemas de biossegurança utilizando *Escherichia coli* BL21 (DE3) como um sistema de expressão para obter antígenos vacinais recombinantes como rETX (Toxina Épsilon recombinante), uma vez que esta cepa não é patogênica.

No entanto, as vacinas de subunidades recombinantes são frequentemente pouco imunogênicas e requerem componentes adicionais para estimular a imunidade protetora (Pasquale et al. 2015) Os adjuvantes proporcionam uma imunogenicidade aumentada aos antígenos vacinais, envolvendo uma combinação de componentes imunes humorais e celulares (Seubert et al. 2008; Pasquale et al. 2015). A formulação da vacina (antígeno / adjuvante) deve ter como objetivo ativar uma variedade de mecanismos para induzir uma resposta protetora que possa

abordar as diversas estratégias de fuga patogênica do micro-organismo que se pretende controlar (Ferreira et al. 2016).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito adjuvante de uma emulsão tripla, em uma vacina experimental com a toxina Épsilon recombinante (rETX) de *C. perfringens*.

4.3.1 Material e Métodos

ETX recombinante

O codon sintético de codificação otimizado para *E. coli* de ETX (Epoch Life Science), sem a sequência de sinal (primeiros 45 resíduos do terminal N) foi removido do plasmídeo pAE e subclonado num vetor de expressão pET28a. Testes de expressão, purificação e inocuidade da rETX foram realizados seguindo o processo descrito por Moreira et al. (2016). A rETX foi purificado por cromatografia de afinidade usando HisTrap™ de alta performance Ni-Sepharose™ (GE healthcare). A concentração de proteína foi determinada usando o kit de ensaio de proteína BCA (Pierce, EUA).

Vacinação dos bovinos

Avaliação da resposta imune humoral em bovinos vacinados com a proteína rETX de *Clostridium perfringens* foi conduzida com 15 bovinos fêmeas (~1,5 anos), Aberdeen Angus, em uma fazenda situada no município de Herval do Sul (RS) (32°00'29"S, 53°30'42"W). Brevemente, a emulsão foi preparada em duas etapas: Na primeira etapa preparou-se uma emulsão do tipo A/O (água/óleo) contendo solução de PSB a 0,4% e 40% do antígeno, na fase oleosa, o Montanide ISA 50 V2. Na segunda etapa foi preparada a emulsão A/O/A usando-se na fase externa solução aquosa de PSB a 0,2% e 60% do antígeno. A emulsão A/O foi aquecida a 40 °C e vertida sobre a fase externa, também aquecida a 40 °C, sob agitação, até formação da emulsão A/O/A.

Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais, cada qual com 5 animais e inoculados por via intramuscular (IM) no dia 0 e 21. **Grupo 1-** Grupo

controle, os animais não receberam nenhum tratamento; **Grupo 2-** animais vacinados com emulsão adjuvante (emulsão de PSB) + rETX 200 µg, dose de 2 mL; **Grupo 3-** animais vacinados com 10% de hidróxido de alumínio Alhydrogel® (Brenntag Nordic, Haslev, Denmark) + rETX 200 µg, dose de 2 mL. As amostras de soro foram coletadas nos dias 0,14, 21, 32, e o soro foi armazenado a -20 °C até seu uso.

Dinâmica de IgG sérica anti-rETX

A resposta de anticorpos foi monitorada por ELISA indireto tendo a rETX como antígeno como já descrito (Moreira et al. 2016) com modificações. As placas foram sensibilizadas com a proteína rETX na concentração de 100 ng por poço; os soros foram diluídos em PBS-T na concentração de 1:800 e aplicados a placa em duplicata; o anticorpo anti bovino conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) foi diluído 1:10.000. Determinou-se a densidade óptica média (OD) a 492 nm para as placas utilizando um leitor de placas de microtítulo (Multiskan MCC / 340 MKII) e foi realizado um ELISA intra placa controle.

Transcrição de citocinas *Ex vivo* em leucócitos periféricos

A resposta celular foi avaliada por cultivo de leucócitos periféricos (2.10^6 células.mL⁻¹) em meio RPMI 1640 (ThermoFisher Scientific) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma®) e antibiótico/antifúngico (Penicilina 10.000 UI.mL⁻¹, estreptomicina 10 mg.mL⁻¹ e Anfotericina B 25 mg.mL⁻¹, Sigma) em placas de 24 poços (TPP®) e incubadas por 24h a 37 °C com 5% de CO₂. A seguir as células foram estimuladas com concanavalina A (Sigma) na concentração de 2,5 µg. mL⁻¹; rRTX na concentração de 10 µg. mL⁻¹; Emulsão adjuvante + rETX 10 µL. Foram incubadas por 24 h a 37 °C com 5% de CO₂. No terceiro dia as células foram cultivadas em TRIzol® (Invitrogen) e armazenadas a -70 °C. Foi feito a extração de RNA pelo método do TRIzol e síntese cDNA a partir de 125 ng de mRNA, conforme as instruções do fabricante (AppliedBiosystems). A técnica usada foi o método quantitativo de reação em cadeia da polimerase (qPCR) para a avaliação da expressão das citocinas: IL-2, IL-15, IL-17.

Análise estatística

O software comercial Statistix 8.0® foi utilizado para análise estatística. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade, seguido da análise de distribuição de frequência. Os dados normalmente distribuídos foram comparados entre os grupos por ANOVA e teste de Tukey. A significância foi estabelecida em $p < 0,05$ e $p < 0,01$ para os testes. A análise estatística da resposta celular foi avaliada usando-se ANOVA seguido do teste Dunnett's.

Os gráficos foram preparados usando o software comercial Graphpad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e Microsoft Excel 2010.

4.3.2 Resultados

Dinâmica da IgG sérica

Os grupos, 2 e 3 responderam a vacinação apresentando títulos de IgG estatisticamente mais elevados que o grupo 1 (controle) em todos os pontos estudados. Não foi detectado aumento no título de IgG contra rETX nos controles, sugerindo que durante o período experimental não houve contato dos animais com *C. perfringens*. O grupo (G2) que utilizou a emulsão adjuvante apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) nos dias 21 e 32, no título de IgG sérica contra a rETX comparando ao grupo 3, hidróxido de alumínio, como adjuvante. O grupo que recebeu a emulsão adjuvante (G2) apresentou diferença estatística ($p < 0,01$) ao grupo controle (G1) nos dias 21 e 32 (Figura 7).

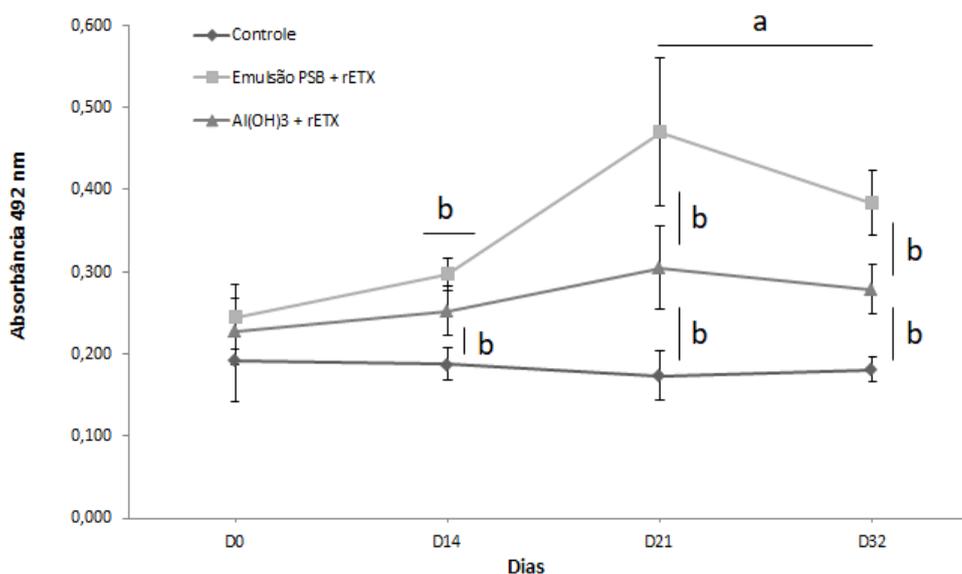


Figura 7. Níveis séricos totais de IgG por ELISA de bovinos vacinados com rETX . Os dados representam a média (+/- desvio padrão) da leitura de absorbância (492 nm de comprimento de onda) dos soros dos bovinos vacinados com rETX. Os animais foram inoculados no dia 0 e reforçados no dia 21. Os soros foram coletados nos dias 0, 14, 21, 32. **a.** representa diferença estatística ($p < 0,01$) entre o grupo emulsão adjuvante + rETX e o grupo controle; **b.** representa diferença estatística de ($p < 0,05$) entre os grupos testados.

Transcrição de citocinas

Os níveis de transcrição de citocina nos linfócitos do sangue periférico (PBL) dos animais vacinados foram avaliados por qPCR no 32º dia do experimento (11 dias após o reforço). Os leucócitos dos bovinos vacinados com a emulsão adjuvante e hidróxido de alumínio estimulados com a rETX, apresentaram um aumento no nível de transcrição da IL-2, IL-15 e IL-17 quando comparado ao grupo controle (sem vacina). O grupo emulsão adjuvante e o grupo hidróxido de alumínio apresentaram aumento da transcrição da IL-2 de 5,3 e 1,4 vezes, respectivamente, quando comparado ao grupo controle. A transcrição de IL-15 apresentou aumento de 7,6 vezes para o grupo emulsão adjuvante e de 2 vezes para o grupo hidróxido de alumínio quando comparado aos animais do grupo controle. Ao avaliarmos a IL-17 observamos que os grupos, emulsão adjuvante e hidróxido de alumínio, apresentaram nível de transcrição da IL-17 de 13,6 e 7,6 respectivamente quando comparados ao controle (Figura 8).

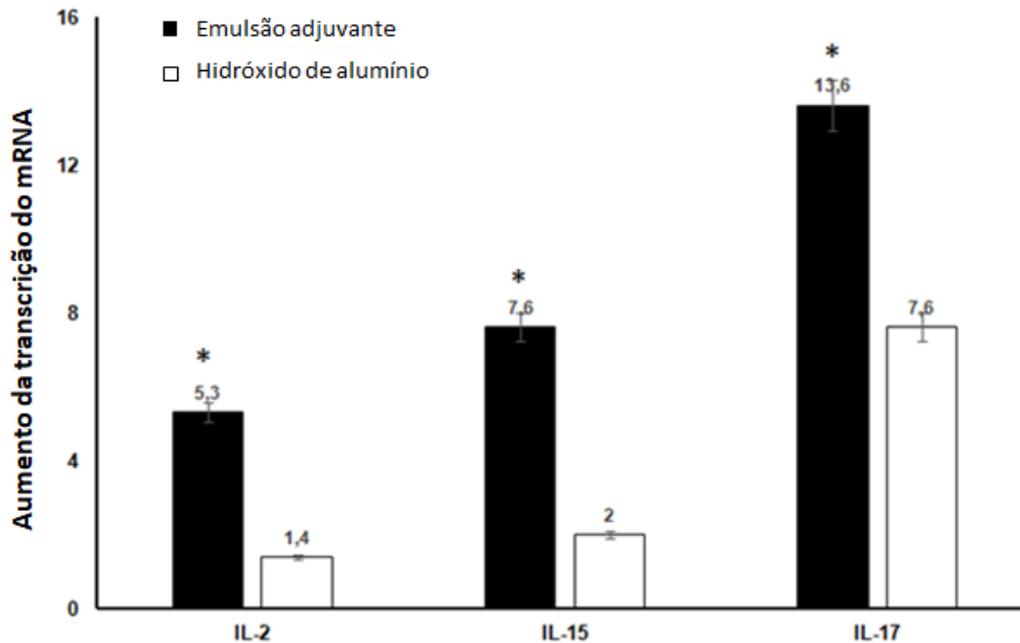


Figura 8. Transcrição relativa das citocinas em PBL. Os dados representam a reação da cadeia de polimerase quantitativa (qPCR) - transcrição do mRNA da IL-2, IL-15 e IL-17. Os dados representam a média (\pm erro padrão) da expressão de mRNA da IL-2, IL-15 e IL-17 de leucócitos de bovinos vacinados com a proteína rETX. A expressão relativa do mRNA foi determinada por *comparative threshold cycle* ($\Delta\Delta$ Ct). O asterisco (*) significa diferença estatística ($p < 0,05$).

4.4.3 Discussão

Clostridium perfringens é patogênica para homens e animais. Sua erradicação é virtualmente impossível (Lobato et al. 2010), por isso as vacinas contra essa bactéria são muito importantes para a criação de animais no Brasil e no mundo. O controle e a profilaxia baseiam-se na vacinação sistemática de rebanhos com a toxina épsilon (Lobato et al. 2010; Moreira et al. 2016). A justificativa para o desenvolvimento de vacinas deve ser guiada por uma compreensão da relação entre o hospedeiro / patógeno e a proteção imunológica. Assim, a seleção de antígenos e sua associação com um adjuvante em uma vacina devem alcançar a modulação necessária da resposta imune para melhorar o tipo de imunidade necessária para proteger o hospedeiro.

O presente estudo avaliou a resposta imune humoral e a transcrição de citocinas em leucócitos periféricos decorrentes de uma vacina experimental formulada com ETX recombinante de *C. perfringens* adjuvada com uma emulsão tripla A/O/A e comparada ao adjuvante hidróxido de alumínio, em bovinos.

O grupo vacinado com a emulsão adjuvante apresentou títulos mais altos de 1,5 vezes, com significância estatística ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo que recebeu o hidróxido de alumínio como adjuvante, 21 dias após a primeira dose da vacina. Moreira et al. (2016) demonstraram resultados similares aos nossos e superiores aos requeridos pelos padrões internacionais (USDA) ao usarem a proteína rETX com hidróxido de alumínio em modelo murino. Neste estudo, Moreira et al. (2016) mostraram que os títulos de anticorpos neutralizantes da toxina ETX foram superiores aos requeridos pelos padrões internacionais. Como obtivemos títulos de anticorpos, por ELISA, similares aos observados por Moreira, podemos sugerir que os mesmos seriam neutralizantes. Desta forma, superiores aos requeridos pelos padrões internacionais (USDA). Apesar de não termos identificados anticorpos neutralizantes, esses resultados são promissores, uma vez que o título de anticorpos produzidos pelo grupo que recebeu a emulsão adjuvante apresentou níveis estatisticamente mais altos de anticorpos, quando comparado ao grupo hidróxido de alumínio ($p < 0,05$) e ao grupo controle ($p < 0,01$).

Os adjuvantes compostos de emulsões água/óleo em geral ativam o sistema imune inato para induzir o sinal necessário para iniciar uma resposta imune adaptativa (Aucouturier et al. 2002). Formam um depósito e aprisionam o antígeno no local de administração, aumentando assim a área de superfície disponível para o antígeno, atraindo diferentes tipos de células, principalmente células dendríticas e macrófagos (Coffman et al. 2010). Este tipo de adjuvante é comumente associado a respostas imunes mistas Th1/Th2.

A goma xantana, constituinte da emulsão estudada, é um polissacarídeo com uma cadeia principal constituída de celulose (1,4) β -D-glucana derivada de *Xanthomonas* spp. (Sutherland, 2001; Borges & Vendruscolo, 2008). As propriedades adjuvantes intrínsecas da xantana como ativador de linfócitos murinos foram originalmente descritas na década de 1980, mas desde então permanecem inexploradas (Ishizaka et al. 1983). Diferentes estudos reportaram que a xantana tem uma resposta biológica através do reconhecimento do receptor Toll-like (TLR-4) (Takeuchi et al. 2009), e essa via leva à expressão de moléculas coestimulatórias

que são essenciais para a indução de uma resposta imune adaptativa eficaz. O nível de IgG no grupo vacinado utilizando a emulsão como adjuvante foi significativamente maior ao grupo do hidróxido de alumínio e controle. A presença da xantana e do óleo na emulsão, sugerem que os dois componentes possam ter atuado através de suas características adjuvantes para induzir a uma significativa melhor resposta de anticorpos contra a rETX.

O hidróxido de alumínio é conhecido por ser um adjuvante relativamente fraco para proteínas recombinantes (Pasquale et al. 2015) e atua formando um depósito dos antígenos e promovendo sua captação pelas células apresentadoras de antígeno (APCs). Sabe-se que fagocitose dos sais de alumínio leva a ativação do inflamossoma/NALP3 e ativação da caspase 1, o que leva a produção de citocinas pró-inflamatórias ((Reed et al. 2009; Eisenbarth et al. 2018).

A IL-2 juntamente com outras citocinas estimula a produção de IFN- γ que controla a diferenciação de linfócitos “naive” em linfócitos Th1 (Boyman & Sprent, 2012; Liao et al. 2013). Diversos estudos indicaram que a IL-2 desempenha um papel importante na ativação de linfócitos T, em sua proliferação e expansão subsequentes (Smith et al. 1988; Jain et al. 1995). A IL-2 estimula a proliferação e a ativação de células efectoras, tais como, linfócitos T, células NK, linfócitos B e macrófagos. Estudos sugeriram que, além de sua atividade indutora de proliferação, a IL-2 também pode desempenhar um papel importante na diferenciação de células Th2 (Cote-Sierra et al. 2004). Recentemente, demonstrou-se que a IL-2 promove a diferenciação da memória dos linfócitos T (Abbas et al. 2018). Também é necessária para a geração de linfócitos T de memória central, no estágio inicial e em momentos posteriores, modulando a magnitude da resposta de memória em longo prazo (Dooms et al. 2007; Abbas et al. 2018). Neste estudo observou-se uma maior transcrição da IL-2 nos PBL dos animais vacinados com a emulsão adjuvante com significância ($p < 0,05$) em comparação ao grupo com o hidróxido de alumínio como adjuvante, sugerindo que a maior transcrição da IL-2 observada nos PBL pela emulsão possa ter contribuído nos maiores títulos de IgG observados neste grupo.

A presença da IL-15 tem um importante impacto na imunidade inata e adaptativa, devido a seus efeitos sobre as células do sistema imunológico (Perera et al. 2012). Além de promover a proliferação de linfócitos T e células NK, a IL-15 pode desempenhar um papel na manutenção de populações de linfócitos de memória e diferenciação de linfócitos B. Estudos com tuberculose, HIV e Influenza em modelos

animais mostraram que vacinas expressando a IL-15, provocaram respostas imunes protetoras e duradouras (Oh et al. 2003; Kolibab et al. 2010; Valkenburga et al. 2014). Estudos mostraram a capacidade da IL-15 de aumentar a maturação das células dendríticas contribuindo com a resposta imune. Saikh et al. (2008) demonstraram que a IL-15 aumentou a eficácia de uma vacina recombinante de enterotoxina estafilocócica aumentando as respostas humorais protetoras, e que a maturação de células dendríticas induzida por IL-15 contribuiu para estes níveis de anticorpos protetores aumentados. Neste estudo, observamos que a vacina formulada com a emulsão tripla apresentou níveis significativos mais elevados de anticorpos contra rETX (Figura 7) e maiores níveis de transcrição de IL-15 ($p < 0,05$), sugerindo seu efeito na modulação da produção de IgG anti-rETX.

A IL-17 não é um indutor potente de inflamação por si só (Gaffen, 2009), seus efeitos durante a inflamação derivam de sua capacidade de recrutar células imunes através da expressão de quimiocinas e da expressão de receptores de citocinas (Zrioual et al. 2009). Estudos indicam que a IL-17 está associada ao desencadeamento de uma resposta Th2 (Zrioual et al. 2009), entretanto, a interação entre a IL-17 e a resposta Th2 é diferente de acordo com o tempo e os tipos de células envolvidas (Kinyanjui et al. 2013). Os neutrófilos ativados por IL-17 iniciam eventos que podem levar a uma resposta do tipo Th2, que por sua vez suprime o recrutamento excessivo de células nucleares polimórficas (Allen et al. 2015). Essas observações concordam com relatos anteriores de que modelos de camundongos com deficiência de IL-17 têm níveis reduzidos de citocinas do tipo Th2 (Nakajima et al. 2014). Enriquecimento de linfócitos T produtores de IL-17 foi relatado em barreiras epiteliais (Romagnoli et al. 2016), onde populações de linfócitos T $\gamma\delta$ expressando IL-17 estão localizadas, desempenhando um papel importante na proteção contra a invasão de patógenos (Zhang et al. 2012). Através da ativação do receptor de IL-17, um processo em cascata resulta em aumento da retenção de linfócitos B nos centros germinativos, e ao fazê-lo aumenta a produção de anticorpos por afinidade (Zhang et al. 2012; Romagnoli et al. 2016). Neste estudo observamos uma significativa transcrição de IL-17 nos PBL dos animais vacinados utilizando a emulsão como adjuvante quando estimulados pela rETX comparado ao grupo que utilizou o hidróxido de alumínio. A maior transcrição de IL-17 pelos animais do grupo emulsão corrobora com os resultados dos níveis de anticorpos observados nos animais vacinados com este adjuvante (Figura 7). O seu papel no recrutamento de

APCs e da expressão de receptores de citocinas (Zrioual et al. 2009), retenção de linfócitos B nos centros germinativos, e a modulação para uma resposta Th2 (IgG1 neutralizantes) é significativo, sendo importante na proteção contra o *C. perfringens* (Figura 8).

Os resultados obtidos neste estudo são promissores, uma vez que a emulsão adjuvante testada foi capaz de promover uma resposta imune humoral superior ao hidróxido de alumínio. Por outro lado, existem algumas limitações ao nosso estudo: os resultados das citocinas baseiam-se apenas na transcrição de PBL e não na quantificação de proteínas. No entanto, existem evidências sugerindo que há uma boa correlação entre o nível de mRNA e sua proteína correspondente (Line et al. 2013; Du et al. 2014). Métodos atuais para detecção direta de IL-15 *ex vivo* são limitados e ainda mais complicados pela meia-vida da IL-15 solúvel (Kobayashi et al. 2000; Stoklasek et al. 2006) desta forma a detecção de sua transcrição é mais eficiente quando avaliada por qPCR. Outra limitação é que não realizamos pesquisa de anticorpos neutralizantes da ETX nos grupos experimentais vacinados, porém obtivemos título de ELISA superiores com a emulsão adjuvante quando comparada ao hidróxido de alumínio, o qual é utilizado em vacinas comerciais submetidas ao controle de eficácia pelos órgãos credenciados.

4.3.4 Conclusão

A emulsão tripla A/O/A contendo polissacarídeo bacteriano foi capaz de incorporar a proteína rETX de *Clostridium perfringens* e demonstrou seu papel adjuvante incrementando a resposta humoral e celular.

5 DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

A resposta imune pode ser modulada pelos adjuvantes com o objetivo de determinar respostas imunes específicas e eficientes direcionadas ao antígeno ou ao micro-organismo. O adjuvante deve modular essas respostas de maneira que a vacina torne-se mais eficiente, que doses possam ser reduzidas e que haja uma redução nos mecanismos causadores de morbidade ou mortalidade pós-vacinal (Resende et al. 2004).

No presente estudo desenvolvemos e avaliamos um adjuvante sob a forma de uma emulsão múltipla do tipo água/óleo/água para ser utilizado com proteínas recombinantes. Além da formulação da emulsão adjuvante, testamos duas proteínas recombinantes expressas nos laboratórios do Departamento de Biotecnologia: EMA-2 de *Theileria equi* (protozoário) expressa em *Pichia pastoris* (Vianna et al. 2014) e ETX de *Clostridium perfringens* (bactéria) expressa em *Escherichia coli* (Moreira et al. 2016).

A falta de estudos com animais ou ensaios que comparem múltiplos adjuvantes com os mesmos antígenos é frequentemente apontada como um impedimento à seleção de adjuvantes (Petrovsky & Cooper, 2011). Extensas comparações de adjuvantes em animais poderiam ser extremamente equivocadas, pois muitos efeitos adjuvantes variam de espécie para espécie (Petrovsky & Cooper, 2011). Os testes neste estudo, foram realizados nos animais alvo das vacinas, rEMA-2 em equinos e rETX em bovinos. Este fato é importante porque a eficácia de um adjuvante depende, além do tipo de imunização desejada, da espécie animal que se pretende imunizar (Spickler & Roth, 2003).

A emulsão adjuvante usada nas vacinas não provocou reações adversas nos camundongos, equinos e bovinos. Roos et al. (2009) relataram que ao vacinar camundongos com o polissacarídeo goma xantana, a reação local foi menor do que as reações provocadas pelo hidróxido de alumínio e o adjuvante completo de Freund (CFA) tanto na primo vacinação como no reforço.

Todos os grupos experimentais que foram vacinados com a emulsão adjuvante mais a proteína recombinante, no presente trabalho, apresentaram níveis de IgG aumentados quando comparados aos grupos vacinados com outros adjuvantes. A ação adjuvante da goma xantana já foi relatada por Takeuchi et al. (2009) quando

mostrou que esse PSB foi capaz de aumentar a atividade antitumoral em camundongos por meio do reconhecimento do receptor TLR4 o que induz a produção de citocinas inflamatórias.

A ação adjuvante de outros PSB já foi reconhecida. Moscovici (2015) ao imunizar, por via intranasal, coelhos com a toxina tetânica junto com micropartículas de alginato, relatou que os PSB podem aumentar a proteção induzida pela vacina, proporcionando resposta imune. Li et al. (2014) demonstraram a eficiência do sulfato de curdulana como adjuvante vacinal ao imunizar camundongos com a proteína recombinante da hepatite B humana.

Os aumentos dos níveis de anticorpos dos grupos vacinados com a emulsão adjuvante também podem ter sido incrementados pela utilização na fase oleosa da emulsão Montanide™. O Montanide™ (SEPPIC) pertence a uma família de adjuvantes à base de óleo que tem sido usado em vacinas experimentais em camundongos, ratos, cães e gatos usando antígenos naturais, recombinantes e sintéticos. Tem sido usado também em vacinas humanas experimentais contra o HIV, malária e câncer de mama (Mohan et al. 2013). A emulsão de Montanide ISA 50 V2, utilizada no presente estudo, é composta por óleo de sequência metabolizável e demonstrou induzir um alto título de anticorpos e respostas CTL (Linfócitos T citotóxicos) em uma variedade de espécies animais (Mohan et al. 2013).

Um dos maiores problemas encontrados para vacinas com adjuvantes oleosos é que o uso frequente pode ocasionar reações adversas tais como formação de granulomas e cistos, em geral ocasionados pelas impurezas dos óleos (Barteling & Vreeswijk, 1991; Gupta et al. 1993). No entanto, neste experimento não foram observadas reações adversas (febre, granulomas, cistos) nos animais testados, uma vez que o óleo usado era do tipo metabolizável (SEPPIC).

Ao vacinarmos camundongos com a emulsão adjuvante mais a proteína rEMA-2 foi observado o desenvolvimento de uma resposta voltada a Th1 aos 60 dias pós-primária vacinação. Esta observação sugere que a associação xantana, óleo e antígeno modularam a resposta em camundongos para uma via mais direcionada a resposta Th1. Foi relatado que o óleo presente na emulsão induz ao desenvolvimento de uma reação balanceada (Th1/Th2) e mais prolongada (Cox & Coulter, 1997; Dummer et al. 2014). Ott et al. (1995) relataram também, que a

resposta induzida por emulsões parece ter um perfil mais equilibrado IgG1:IgG2a quando comparamos com os sais de alumínio (Pellegrino et al. 2015).

Os equinos vacinados com a emulsão adjuvante também apresentaram níveis de IgG significativamente ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) mais altos quando comparados aos outros grupos (rEMA-2, PSB e hidróxido de alumínio) fato confirmado também na titulação dos soros do dia 35 pós-primo vacinação. Estes dados são bastante importantes, uma vez que não existe vacina disponível para theileriose equina (Bahrami et al. 2014; OIE, 2017) e a vacina desenvolvida neste estudo com a emulsão adjuvante torna-se uma possível alternativa.

Os bovinos vacinados com a proteína rETX associado à emulsão adjuvante apresentaram títulos mais altos, com significância estatística ($p < 0,05$) quando comparados aos bovinos que receberam o hidróxido de alumínio como adjuvante. Assim como ocorreu no experimento com a proteína rEMA-2, a resposta de anticorpos contra a rETX pode ter sido devido às características adjuvantes dos componentes da emulsão, xantana, óleo e o próprio antígeno.

Neste estudo, demonstramos que a vacina que usou como adjuvante a emulsão apresentou níveis significativos ($p < 0,05$) mais elevados de anticorpos contra rETX, e maiores níveis de transcrição de IL-2, IL-15 e IL-17 quando estimulados com a proteína rETX. A IL-2 estimula a produção de IFN- γ que atua na diferenciação dos linfócitos “naive” em linfócitos Th1 (Boyman & Sprent, 2012; Liao et al. 2013). Schuch et al. 2017 quando imunizaram camundongos com OVA-xantana obtiveram um aumento do nível de IFN- γ o que levou a uma resposta mais Th1, sugerindo que a emulsão adjuvante pode levar a respostas celulares. A IL-2 também pode desempenhar um papel importante na diferenciação de células Th2 (Cote-Sierra et al. 2004), o que também ocorre com a IL-15 que aumenta a maturação das células dendríticas contribuindo com a resposta imune, aumentando as respostas humorais protetoras (Saikh et al. 2008). Fato que observamos com o maior aumento do nível de anticorpos no grupo que recebeu a emulsão adjuvante.

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória produzida por linfócitos Th17 e que são conhecidas por estimular GM-CSF (Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos) promovendo a expansão das linhagens mieloides (Norton et al. 2001). Tem importante papel no recrutamento de APCs, retenção de linfócitos B nos centros germinativos e na modulação para uma resposta Th2 (Zrioual et al. 2009). O

que mais uma vez corrobora nossos resultados do aumento do nível significativo ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) de anticorpos nos grupos vacinados com a emulsão adjuvante.

A administração de antígenos ainda é um desafio, pois eles podem apresentar meia-vida curta no organismo, devido à degradação enzimática e pequena permeabilidade através das membranas biológicas. Independente da via de administração usada, muitas macromoléculas não atingem o local de ação necessário. Um sistema de entrega de antígenos como emulsões pode superar algumas dessas limitações, quer protegendo o antígeno da degradação quer aumentando sua permeabilidade através das membranas e/ou agindo na forma de liberação lenta e no local específico que se espera (Melo et al. 2012). Com o uso da emulsão adjuvante obtivemos níveis detectáveis de anticorpos durante todos os pontos do experimento: camundongos até 60 dias, equinos até 85 dias e bovinos até 32 dias (tempos de experimentação), sugerindo que a emulsão adjuvante foi capaz de liberar o antígeno em etapas. Primeiro foram liberados os 60% do antígeno da fase externa da emulsão, fazendo a primeira sensibilização do sistema imune. Após, o óleo da fase mediana agiria como um protetor da fase mais interna da emulsão e levaria a uma indução da resposta imune mais prolongada (Roos et al. 2009) e por último seriam liberados os 40% do antígeno da fase interna para manutenção da resposta imune.

A emulsão adjuvante composta da goma xantana e do óleo Montanide ISA 50 V2 apresentou-se de simples elaboração, manteve-se estável por até 6 meses sob refrigeração (4 °C), sem alterações de cor e odor, sendo inócua e possuindo seringabilidade e com a possibilidade da incorporação de uma gama variável de antígenos.

Não existe um adjuvante universal que sirva para todos os antígenos (Leclerc, 2003). A seleção racional de adjuvantes deve atender qual resposta imune se pretende (Th1, Th2, anticorpos e linfócitos T citotóxicos) (Leclerc, 2003). No entanto, mais estudos são necessários para determinar mais amplamente qual o mecanismo adjuvante da emulsão tripla composta do PSB, goma xantana, emulsificada com antígenos recombinantes.

6 CONCLUSÃO GERAL

Baseado nos resultados obtidos com as proteínas recombinantes testadas, conclui-se que a emulsão tripla, A/O/A com polissacarídeo bacteriano, goma xantana e o óleo Montanide ISA 50 V2, possui ação adjuvante.

7 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K., TROTTA, E., SIMEONOV, D., MARSON, A. & BLUESTONE, J. (2018). Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Science Immunology* | Review. 3. p. 1–8.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Brasil (ANVS). (2007). Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. Brasília, DF. 127.
- ALANAZI, A.D., SAID, A.E., MORIN-ADELIN, V., ALYOUSIF, M.S. & SLAPETA, J. (2014). Quantitative PCR detection of *Theileria equi* using laboratory workflows to detect asymptomatic persistently infected horses. *Veterinary Parasitology*. 206. p. 138–145.
- ALLEN, J.E., SUTHERLAND, T.E. & RÜCKERL, D. (2015). IL-17 and neutrophils: unexpected players in the type 2 immune response. *Current Opinion in Immunology*. 34. p. 99–106.
- ALTAY, F. & GUNASEKARAN, S. (2006). Influence of drying temperature, water content, and heating rate on gelatinization of corn starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54. p. 4235–4245.
- ANTUNES, J.M.A.P., ALLENDORF, S.D., APPOLINÁRIO, C.M., PERES, M.G., VICENTE, A.F., FONSECA, C.R.S., DEMONER, L.C. & MEGID, J. (2012). A Evolução das vacinas anti-rábicas na Medicina Veterinária. *Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia*. 6(28), Ed. 215. p. 1429.
- AUCOUTURIER, J., DUPUIS, L. & GANNE, V. (2001). Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*. 19(17-19). p. 2666–2672.
- AUCOUTURIER, J., DUPUIS, L., DEVILLE, S., ASCARATEIL, S. & GANNE, V. (2002). Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert Review of Vaccines*. 1(1). p. 111–118.
- AWATE, S., BABIUK, L.A. & MUTWIRI, G. (2013). Mechanisms of action of adjuvants. *Frontiers in Immunology | Immunotherapies and Vaccines*. 4(114). p. 1–10.
- BACELO, K.L., HARTWIG, D.D., SEIXAS, F.K., SCHUCH, R., MOREIRA, A.S., AMARAL, M., COLLARES, T., VENDRUSCOLO, C.T., MCBRIDE, A.J.A. & DELLAGOSTIN, O.A. (2014). Xanthan Gum as an Adjuvant in a Subunit Vaccine Preparation against Leptospirosis. *BioMedical Research International*. v. 2014. 10 pages.
- BAHRAMI, S., GHADRAN, A.R., MIRABDOLLAHI, S.M. & FAYED, M.R. (2014). Diagnosis of subclinical equine theileriosis in center of Iran using parasitological and molecular methods. *Tropical Biomedicine*. 31(1). p. 110–117.
- BANZHOFF, A., GASPARINI, R., LAGHI-PASINI, F., STANISCIA, T., DURANDO, P., MONTOMOLI, E., CAPECCHI, P.L., DI GIOVANNI, P., STICCHI, L. & GENTILE, C. (2009). MF59-adjuvanted H5N1 vaccine induces immunologic memory and heterotypic antibody responses in non-elderly and elderly adults. *PLOS ONE*. 4e4384.

- BARTELING, S.J. & VREESWIJK, J. (1991). Developments in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*. 9. p. 75–88.
- BASHIRU, G. & BAHAMAN, A.R. (2018). Advances & challenges in leptospiral vaccine development. *Indian Journal of Medical Research*. 147. p.15–22.
- BOEHRINGER INGELHEIM. (2017). Disponível em: <https://www.boehringer-ingelheim.com.br/saude-animal/pets/caes>. Acessado em: 09 de agosto de 2018.
- BORGES, C.D. & VENDRUSCOLO, C.T. (2008). Xanthan Gum: characteristics and operational conditions of production. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*. 29(2). p. 171–188.
- BOYMAN, O. & SPRENT, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 12(3). p. 180–190.
- BRASIL (2004). Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Brasília: Núcleo de Assessoramento em Comunicação Social e Institucional. Poder Executivo. p.12–19, 26,27.
- BUENO, S.M. & GARCIA-CRUZ, C.H. (2001). The influence of fermentation time and the presence of salts in the rheology of the fermentation broth of a polysaccharide-producing bacteria free of soil. *Journal of Food Engineering*. 50. p. 41–46.
- BUTNARU, D. & SHOENFELD, Y. (2015). Adjuvants and lymphoma risk as part of the ASIA spectrum. *Immunology Research*. 61. p. 79–89.
- CHEN, W., KUOLEE, R. & YAN, H. (2010). The potential of 3', 5'- cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) as an effective vaccine adjuvant. *Vaccine*. 28. p. 3080–3085.
- CHIOU, C.J., TSENG, L.P., DENG, M.C., JIANG, P.R., TASI, S.L., CHUNG, T.W., HUANG, Y.Y. & LIU, D.Z. (2009). Mucoadhesive liposomes for intranasal immunization with an avian influenza virus vaccine in chickens. *Biomaterials*. 30(29). p. 5862–5868.
- COFFMAN, R.L., SHER, A. & SEDER, R.A. (2010). Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immunity*. 33(4). p. 492 – 503.
- COTE-SIERRA, J., FOUCRAS, G., GUO, L., CHIODETTI, L., YOUNG, H.A., HU-LI, J., ZHU, J. & PAUL, W.E. (2004). Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101(11). p. 3880–3885.
- COYNE, M.J., YULE, T.D., HARDING, M.J., TRESNAN, D.B. & MCGAVIN, D. (2001). Duration of immunity in dogs after vaccination or naturally acquired infection. *Veterinary Record*. 149(17). p. 509–515.
- COX, J.C. & COULTER, A.R. (1997). Adjuvants- a classification and review of their modes of action. *Vaccine*. 15. p. 248–256.
- CUNHA, C.W., MCGUIRE, T.C., KAPMEYER, L.S., HINES, S.A., LOPEZ, A.M., DELLAGOSTIN, O.A. & KNOWLES, D.P. (2006). Development of Specific Immunoglobulin G_a (IgG_a) and IgG_b Antibodies Correlates with Control of Parasitemia in *Babesia equi* Infection. *Clinical and Vaccine Immunology*. 13(2). p. 297–300.

- CUNHA, R.C., ANDREOTTI, R. & LEITE, F.P.L. (2011). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: expression and characterization of Bm86-CG in *Pichia pastoris*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 20 (2), on line.
- DIAZ, P.S., VENDRUSCOLO, C.T. & VENDRUSCOLO, J.L.S. (2004). Reologia de Xantana: uma Revisão sobre a Influência de Eletrólitos na Viscosidade de Soluções Aquosas de Gomas Xantana. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina. 25(1). p. 15–28.
- DICKINSON, E. (2012). Emulsion gels: The structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets. *Food Hydrocolloids*. 28(1). p. 224–241.
- DIETZSCHOLD, M.L., FABER, M., MATTIS, J.A., PAK, K.Y., SCHNELL, M.J. & DIETZSCHOLD, B. (2004). In vitro growth and stability of recombinant rabies virus designed for vaccination of wildlife. *Vaccines*. 23. p. 518–524.
- DINIZ, M.O & FERREIRA, L.C.S. (2010). Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. *Estudos Avançados*. 24(70), São Paulo.
- DOOMS, H., WOLSLEGEL, K., LIN, P. & ABBAS, A.K. (2007). Interleukin-2 enhances CD4⁺ T cell memory by promoting the generation of IL-7R α -expressing cells. *Journal of Experimental Medicine*. 204. p. 547–555.
- DU, H.W., CHEN, G.Y., YANG, C.H., LI, C.B., XUN, Y.P., LIU, J., CHEN, P. & SHI, L.L. (2014). Multiple correlations of mRNA expression and protein abundance in human cytokine profile. *Molecular Biology Reports*. 41. p. 6985–6993.
- DUMMER, L.A., ARAUJO, I.L., FINGER, P.F., SANTOS Jr., A.G., ROSA, M.C., CONCEIÇÃO, F.R., van DRUNEN LITTEL- van den HURK, S. & LEITE, F.P.L. (2014). Immune responses of mice against recombinant bovine herpesvirus 5 glycoprotein D. *Vaccine*. 32(21). p. 2413–2419.
- EISENBARTH, S.C., COLEGIO, O.R., O'CONNOR, W., SUTTERWALA, F.S. & FLAVEL, R.A. (2008). Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory of aluminium adjuvants. *Nature*. 453. p. 112 –1126.
- ERNANDES, F.M.P.G. & GARCIA-CRUZ, C.H. (2005). Levana Bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. *Semina: Ciências Agrárias*. 26(1). p. 71–82.
- FAWCETT, D.W., DOXSEY, S., STAGG, D.A. & YOUNG, A.S. (1982). The entry of sporozoites of *Theileria parva* into bovine lymphocytes in vitro. Electron microscopic observations. *European Journal of Cell Biology*. 27. p. 10–21.
- FERRAZ, E.G., SILVEIRA, B.B.B., SARMENTO, V.A. & SANTOS, J.N. (2011). Toll-Like Receptors: regulation of the immune responses. *Revista Gaúcha de Odontologia*. 59(3). p. 483–490.
- FERREIRA, M.R.A., MOREIRA, G.M.S.G., CUNHA, C.E.P., MENDONÇA, M., SALVARANI, F.M., MOREIRA, A.N. & CONCEIÇÃO, F.R. (2016). Recombinant Alpha, Beta, and Epsilon Toxins of *Clostridium perfringens*: Production Strategies and Applications as Veterinary Vaccines. *Toxins*. 8. p. 34.
- FIGUEIREDO, A.S. & ARAÚJO Jr., J.P. (2011). Feline leukemia virus: infection outcomes, diagnostic techniques and vaccine efficacy analysis employing sensitive techniques of virus detection. *Ciência Rural*. 41(11). p.1952–1959.

- FIGUEIREDO, B.K., MARTINI, P.C. & MICHELIN, D.C. (2014). Desenvolvimento e estabilidade preliminar de um fitocosmético contendo extrato de chá verde (*Camellia sinensis*) (L.) Kuntze (Theaceae). *Revista Brasileira de Farmácia*. 95(2). p. 770–788.
- FONTANIELLA, B., RODRÍGUES, C.W., PIÑÓN, D., VICENTE, C. & LEGAZ, M.E. (2002). Identification of xanthans isolated from sugarcane juices obtained from scalded plants infected by *Xanthomonas albilineans*. *Journal of Chromatography*. 770. p. 275–81.
- FORD, R.B. (2009). infectious disease update. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/b5df/6aba30ebeaddc93e26bb5d53c3a6b805812f.pdf>. Acessado em: 10 de agosto de 2018.
- FRANZOL, A. & REZENDE, M.C. (2015). Emulsion stability: a case study involving anionic, cationic and nonionic emulsifiers. *Polímeros*. 25. p.1–9.
- GAFFEN, S.L. (2009). Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nature Reviews Immunology*. 9. p. 556–67.
- GARG, R., BABIUK, L., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. & GERDTS, V. (2017). A novel combination adjuvant platform for human and animal vaccines. *Vaccine*. 35 (35 pt. A). p. 4486–4489.
- GUARINO, C., ASBIE, S., ROHDE, J., GLASER, A. & WAGNER, B. (2017). Vaccination of horses with Lyme vaccines for dogs induces short-lasting antibody responses. *Vaccine*. 35(33). p. 4140–4147.
- GUIMARÃES, L.E., BAKER, B., PERRICONE, C. & SHOENFELD, Y. (2015). Vaccines, adjuvants and autoimmunity. *Pharmacological Research*. 100. p. 190–209.
- GUPTA, R.K., RELYVELD, E.H., LINDBLAD, E.B., BIZZINI, B., BEN-EFRAIM, S. & GUPTA, C.K. (1993). Adjuvants- a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine*. 11. p. 293–306.
- HACKETT, C.J. & HARN, D.A. Jr. (2006). Vaccine Adjuvants – Immunological and Clinical principles. Preface.
- HARPER, M., BOYCE, J.D. & ADLER, B. (2006). *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiology Letters*. 265. p. 1–10.
- HAASE, M.F. & BRUJIC, J. (2014). Tailoring of High-order multiple emulsions by the liquid-liquid phase separation of ternary mixtures. *Angewandte international edition*. 53. p. 1–6.
- HORA, V.P., CONCEIÇÃO, F.R., DELLAGOSTIN, O.A. & DOOLAN, D.L. (2011). Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants. *Vaccine*. 29. p. 1538–1544.
- HUNTER, R.L. (2002). Overview of vaccine adjuvants: present and future. *Vaccine*. 20. S7–S12.
- ISAAC, V.L.B., CEFALI, L.C., CHIARI, B.G., OLIVEIRA, C.C.L.G., SALGADO, H.R. N. & CORRÊA, M.A. (2008). Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 29(1). p. 81–96.

- ISHIZAKA, S., SUGAWARA, I., HASUMA, T., MORISAWA, S. & MÖLLER, G. (1983). Immune responses to xanthan gum. I. The characteristics of lymphocyte activation by xanthan gum. *European Journal of Immunology*. 13(3). p. 225–231.
- JAIN, J., LOH, C. & RAO, A. (1995). Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Current Opinion of Immunology*. 7. p. 333–342.
- JANSEN, A., SCHÖNEBERG, I., FRANK, C., ALPERS, K., SCHNEIDER, T. & STARK, K. (2005). Leptospirosis in Germany, 1962–2003. *Emerging Infectious Diseases journal*. 11. p. 1048–1054.
- JOSEFSBERG, J.O. & BUCKLAND, B. (2012). Vaccine Process Technology. *Biotechnology and Bioengineering*. 109(6). p. 1443–1460.
- KAPPEMEYER, L.S., PERRYMAN, L.E. & KNOWLES, D.P. (1993). A *Babesia equi* gene encodes a surface protein with homology to Theileria species. *Molecular and Biochemistry Parasitology*. 62. p. 121–124.
- KAPPEMEYER, L.S., THIAGARAJAN, M., HERNDON, D.R., RAMSAY, J.D., CALER, E., DJIKENG, A., GILLESPIES, J.J., LAU, A.O.T., ROALSON, E.H., SILVA, J.C., SILVA, M.G., SUAREZ, C.E., UETI, M.W., NENE, V.M., MEALEY, R.H., KNOWLES, D.P. & BRAYTON, K.A. (2012). Comparative genomic analysis and phylogenetic position of *Theileria equi*. *BMC Genomics*. 13(603). p. 5–13.
- KEITEL, W.A., CAMPBELL, J.D., TREANOR, J.J., WALTER, E.B., PATEL, S.M., HE, F., NOAH, D.L. & HILL, H. (2008). Safety and immunogenicity of an inactivated influenza A/H5N1 vaccine given with or without aluminum hydroxide to healthy adults: results of a Phase I-II randomized clinical trial. *The Journal of Infectious Diseases*. 198(9). p. 1309–1316.
- KHOURYEH, H.A., ARAMOUNI, F.M. & HERALD, T.J. (2005). Physical, chemical and sensory properties of sugar-free jelly. *Journal of Food Quality*, 28(2). p. 179–190.
- KNOWLES, D.P., PERRYMAN, L.E., GOFF, W.L., MILLER, C.D., HARRINGTON, R.D. & GORHAM, J.R. (1991). A monoclonal antibody defines a geographically conserved surface protein of *Babesia equi* merozoites. *Infection and Immunity*. 59. p. 2314–2417.
- KNOWLES Jr., D.P., KAPPEMEYER, L.S., STILLER, D., HENNAGER, S.G. & PERRYMAN, L.E. (1992). Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identified horses infected with *Babesia equi*. *Journal of Clinical Microbiology*. 30. p. 3122–3126.
- KNOWLES Jr., D.P., KAPPEMEYER, L.S. & PERRYMAN, L.E. (1994). Specific immune responses are required to control parasitemia in *Babesia equi* infection. *Infection and Immunity*. 62. p. 1909–1913.
- KINYANJUI, M.W., SHAN, J., NAKADA, E.M., QURESHI, S.T. & FIXMAN, E.D. (2013). Dose-Dependent Effects of IL-17 on IL-13-Induced Airway Inflammatory Responses and Airway Hyperresponsiveness. *Journal of Immunology*. 190. p. 3859–3868.
- KOBAYASHI, H., CARRASQUILLO, J.A., PAIK, C.H., WALDMANN, T.A. & TAGAYA, Y. (2000). Differences of biodistribution, pharmacokinetics, and tumor targeting between interleukins 2 and 15. *Cancer Research*. 60. p. 3577–3583.

- KOLIBAB, K., YANG, A., DERRICK, S.C., WALDMANN, T.A., PERERA, L.P. & MORRIS, S.L. (2010). Highly persistent and effective prime/boost regimens against tuberculosis that use a multivalent modified vaccine virus Ankara-based tuberculosis vaccine with interleukin-15 as a molecular adjuvant. *Clinical and Vaccine Immunology*. 17(5). p. 793–801.
- KOMMAREDDY, S., SINGH, M. & O'HAGAN, D.T. (2017). MF59: A Safe and Potent Adjuvant for Human Use. *Immunopotentiators in Modern Vaccines*. 2nd ed. p. 249–263.
- KUMAR, S., MALHOTRA, D.V. & NICHANJ, A.K. (2002). Vaccination of donkeys against *Babesia equi* using killed merozoite immunogen. *Veterinary Parasitology*. 106. p.19–33.
- KUMAR, S., YOKOYAMA, N., KIM, J.Y., HUANG, X., INOUE, N., XUAN, X., IGARASHI, I. & SUGIMOTO, C. (2004). Expression of *Babesia equi* EMA-1 and EMA-2 during merozoite developmental stages in erythrocyte and their interaction with erythrocytic membrane skeleton. *Molecular Biochemical Parasitology*. 133. p. 221–227.
- KUMAR, S., KUMAR, R., GUPTA, A.K., YADAV, S.C., GOYAL, S.K., KHURANA, S.K. & SINGH, R.K. (2013). Development of EMA-2 recombinant antigen based enzyme-linked immunosorbent assay for seroprevalence studies of *Theileria equi* in Indian equine population. *Veterinary Parasitology*. 198. P. 10–17.
- LAZZARI, G.G., SAKAMOTO, F.C. & CARVALHO, F.C. (2017). Caracterização da bioadesão e seringabilidade de sistemas baseados em tensoativos e hidrogéis. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*. 38(1).
- LEE, B.Y., ERCIUS, A.K. & SMITH, K.J. (2009). A Predictive Model of the Economic Effects of an Influenza Vaccine Adjuvant for the Older Adult (Age 65 and Over) Population. *National Institutes of Health*. 27(16). p. 2251–2257.
- LIAO, W., LIN, J.X. & LEONARD, W.J. (2013). Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity*. 38(1) p. 13–25.
- LI, P., TAN, H., XU, D., YIN, F., CHENG, Y. & ZHANG, X. (2014). Effect and mechanisms of curdlan sulfate on inhibiting HBV infection and acting as an HB vaccine adjuvant. *Carbohydrate Polymers*. 110. p. 446–455.
- LINE, S.R.P., LIU, X., DE SOUZA, A. & YU, F. (2013). Translational signatures and mRNA levels are highly correlated in human stably expressed genes. *BMC Genomics*. 14. p. 268.
- LIPPI, G., TARGHER, G. & FRANCHINI, M. (2009). Vaccination, squalene and anti-squalene antibodies: facts or fiction? *European Journal of Internal Medicine*. 21(2). p. 70–73.
- LOBATO, F.C.F., LIMA, C.G.R.D., ASSIS, R.A., PIRES, P.S., SILVA, R.O.S., SALVARANI, F.M., CARMO, A.O., CONTIGLI, C. & KALAPOTHAKIS, E. (2010). Potency against enterotoxemia of a recombinant *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid in ruminants. *Vaccine*. 28. p. 6125–6127.
- LORDING, P.M. (2008). Erythrocytes. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, Philadelphia. 24. p. 225–237.
- LUVIELMO, M.M. & SCAMPARINI, A.R.P. (2009). Xanthan gum: Production, recovery, properties and application. *Estudos tecnológicos*. 5(1). p. 50–67.

- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). (1998). Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=58090151>. Acessado em: 10 de agosto de 2018.
- MARRACK, P., MCKEE, A.S. & MUNKS, M.W. (2009). Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nature Reviews Immunology*. 9. p. 287–293.
- MARTINON, F., PETRILLI, V., MAYOR, A., TARDIVEL, A. & TSCHOPP, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 440. p. 237–241.
- MAUGERI, FILHO F. (2001). Produção de Polissacarídeos. In: Lima U. A., Aquarone E., Borzani W. & Schmidell W. *Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo, Editora Edgard Blücher Ltda. 3. p. 125–153.
- MEALEY, R.H., KAPPEMEYER, L.S., UETI, M.W., WAGNER, B. & KNOWLES, D.P. (2012). Protective Effects of Passively Transferred Merozoite-Specific Antibodies against *Theileria equi* in Horses with Severe Combined Immunodeficiency. *Clinical and Vaccine Immunology*. 19(1). p. 100–104.
- MEEUSEN, E.N.T., WALKER, J., PETERS, A., PASTORET, P.P. & JUNGERSE, G. (2007). Current Status of Veterinary Vaccines. *Clinical Microbiology Reviews*. p. 489–51.
- MELO, C.S., CUNHA Jr., A.S. & FIALHO, S.L. (2012). Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos. *Revista de Ciência Farmacêutica Básica Aplicada*. 33(4). p. 469–477.
- MEYER, E.L., FULLER, G.G., CLARK, R.C. & KULICKE, W.M. (1993). Investigation of xanthan gum solution behavior under shear-flow using rheoptical techniques. *Macromolecules*. 26(3). p. 504–511.
- MIROTTI, L., CUSTÓDIO, R.W.A., GOMES, E., RAMMAURO, F., ARAUJO, E.F., CALICH, V.L.G. & RUSSO, M. (2017). CpG-ODN shapes alum adjuvant activity signaling via MyD88 and IL-10. *Frontiers in Immunology*. 8. p. 1–13.
- MOHAN, T., VERMA, P. & RAO, D.N. (2013). Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead. *Indian Journal of Medical Research*. 138. p. 779–795.
- MOREIRA, G.M.S.G., SALVARANI, F.M., CUNHA, C.E.P., MENDONÇA, M., MOREIRA, A.N., GONÇALVES, L.A., PIRES, P.S., LOBATO, F.C.F. & CONCEIÇÃO, F.R. (2016). Immunogenicity of a Trivalent Recombinant Vaccine Against *Clostridium perfringens* Alpha, Beta, and Epsilon Toxins in Farm Ruminants. *Scientific Reports*. 6:22816.
- MORRISON, W.I. & MCKEEVER, D.J. (2006). Current status of vaccine development against *Theileria* parasites. *Parasitology*. 133. suppl: S169-87.
- MOSCA, F., TRITTO, E., MUZZI, A., MONACI, E., BAGNOLI, F., LAVARONE, C., O'HAGAN, D., RAPPUOLI, R. & de GREGORIO, E. (2008). Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proceeding of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 105(30). p. 10501–10506.
- MOSCOVICI, M. (2015). Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Review Article. Frontier Microbiology*. 6. p. 1012.

- MOTA, E.F., LIMA, M.G.S. & MELO, D.F. (2006). Adjuvantes Imunológicos: Avanços e perspectivas. *Ciência Animal*. 16(2), p. 79–88.
- MUTISO, J.M., MACHARIAA, J.C. & GICHERU, M.M. (2010). A review of adjuvants for *Leishmania* vaccine candidates. *Journal of Biomedical Research*. 24(1). p. 16–25.
- NAKAJIMA, S., KITOH, A., EGAWA, G., NATSUAKI, Y., NAKAMIZO, S., MONIAGA, C.S., OTSUKA, A., HONDA, T., HANAKAWA, S., AMANO, W., IWAKURA, Y., NAKAE, S., KUBO, M., MIYACHI, Y. & KABASHIMA, K. (2014). IL-17A as an Inducer for Th2 Immune Responses in Murine Atopic Dermatitis Models. *Journal of Investigative Dermatology*. 134. p. 2122–2130.
- NASCIMENTO, I.P. & LEITE, L.C.C. (2012). Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 45(12). p. 1102–1111.
- NAVARRETE, R.C., SEHEULT, J.M. & COFFEY, M.D. (2001). New Biopolymer for drilling, drill-in, completions, spacer, and coil-tubing fluid, Part II. In: International Symposium on Oilfield Chemistry SPE 64982, Houston. p. 1–15.
- NOBIRON, I., THOMPSON, I., BROWNLIE, J. & COLLINS, M. (2001). Cytokine adjuvancity of BVDV DNA vaccine enhances both humoral and cellular immune responses in mice. *Vaccine*. 15. p. 4226–4235.
- O'HAGAN, D.T. (2000). An overview of adjuvant use. From: *Methods in Molecular Medicine*. vol. 42: *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols*. Cap. 1. p. 2.
- O'HAGAN, D.T. & SINGH, M. (2003). Microparticles as vaccine adjuvants and delivery systems. *Expert Review of Vaccines*. 2(2). p. 269–283.
- O'HAGAN, D.T. & VALIANTE, N.M. (2003). Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nature Reviews – Drug Discovery*. 2(9). p. 727–735.
- O'HAGAN, D.T., OTT, G.S., de GREGORIO, E. & SEUBERT, A. (2012). The mechanism of action of MF59 – an innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine*. 30(29). p. 4341–4348.
- OH, S., BERZOFSKY, J.A., BURKE, D.S., WALDMANN, T.A. & PERERA, L.P. (2003). Coadministration of HIV vaccine vectors with vaccinia viruses expressing IL-15 but not IL-2 induces long-lasting cellular immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States*. 100(6). p. 3392–3397.
- OIE. Equine piroplasmosis, in *Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals*, 2017. Disponível em:
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_equine_piroplasmosis.pdf Chapter 12.7. Acessado em: 10 de junho de 2018.
- OLIVEIRA, P.D., VENDRUSCOLO, C.T., BORGES, C.D., MICHEL, R.C., MANO, E., LOMBA R. T. & MELLO L. A. M. (2013). Comparative Evaluation of Xanthans Properties Produced by *Pathovar Pruni* and *Clairana* with Commercial Xanthan to Predict their Uses. *Polímeros*. 23(3). p. 417–424.

- OTT, G., BARCHFELD, G.L., CHERNOFF, D., RADHAKRISHNAN, R., VAN HOOGEVEST, P. & VAN NEST, G. (1995). MF59 Design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines. *Pharmaceutical Biotechnology*. 6. p. 277–296.
- PALMER, G.H. & McELWAIN, T.F. (1995). Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Parasitology Today*, Amsterdam. 57. p. 233–253.
- PASARE, C. & MEDZHITOV, R. (2005). Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature*. 438/7066 p. 364–368.
- PASQUALE, A.D., PREISS, S., SILVA, F.T. & GARÇON, N. (2015). Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines*. 3. p. 320–343.
- PELLEGRINO, P., CLEMENTI, E. & RADICE, S. (2015). On vaccine's adjuvants and autoimmunity: Current evidence and future perspectives. *Autoimmunity Reviews*. 14. p. 880–888.
- PEREIRA, L.J.B. & GARCIA-ROJAS, E.E. (2015). Emulsões múltiplas: formação e aplicação em microencapsulamento de componentes bioativos. *Ciência Rural*. 45(1). p.15–162.
- PERERA, P.Y., LICHY, J.H., WALDMANN, T.A. & PERERA, L.P. (2012). The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use. *Microbes and Infections*. 14(3). p. 247–261.
- PETROVSKI, N. & COOPER, P.D. (2011). Carbohydrate-based immune adjuvants. *Expert Review vaccines*. 10(4). p. 523–537.
- PEYREFITTE, G., MARTINI, M.C. & CHIVOT, M. (1998). Cosmetologia – Biologia Geral. Edição em português do original francês: Cahiers D' Esthétique – Cosmétique, n°1: *Biologie de La Peau*, 3° Ed., p. 24–28.
- PINTO, E.F., MATTA, N.E. & CRUZ, A.M. (2011). Vaccines: Progress and Challenges for the Control of Preventable Diseases. *Acta Biológica Colombiana*. 16(3).p. 197–212.
- PRISTA, L.N., ALVES, C. & MOR, R.M. (1990). Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica. Volume 1. 4° ed. p. 147.
- RAMON, G. (1926). *Annals de L'Institut Pasteur*. 40. p. 1–10.
- RAMSAY, J.D., UETI, M.W., JOHNSON, W.C., SCOLES, G.A., KNOWLES, D.P., MEALEY, R.H. (2013). Lymphocytes and Macrophages are infected by *Theileria equi*, but T cells and B cells are not required to establish infection *in vivo*. *PLOS ONE*. 8 (10): e76996.
- REED, S.G., BERTHOLET, S., COLER, R.N. & FRIEDE, M. (2009). New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunology*. 30(1). p. 23–32.
- RESENDE, F.C.B., PASSOLD, J., FERREIRA, S.I.A., ZANETTI, C.R. & LIMA, H.C. (2004). Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em seres humanos ou animais. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*. 27(3). p. 116–124.
- ROCHA, P.H., ASSIS, R.A., LOBATO, F.C.F., CARDOSO, V.N. & HENEINE, L.G.D. (2008). Stability and toxicity of *Clostridium perfringens* type D epsilon prototoxin treated by iodine. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 60(4). p. 821–824.

- RODRIGUEZ, M., RUBIERA, R., PENICHER, M., MONTESINOS, R., CREMATA, J., FALCON, V., SANCHEZ, G., BRINGAS, R., CORDOVÉS, C., VALDES, M., LEONART, R., HERRERA, L. & de la FUENTE, J. (1994). High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *Journal of Biotechnology*. 33(2). p.135–146.
- ROMAGNOLI, P.A., SHERIDAN, B.S., PHAM, Q-M., LEFRANÇOIS, L. & KHANNA, K.M. (2016). IL-17A-producing resident memory $\gamma\delta$ T cells orchestrate the innate immune response to secondary oral *Listeria monocytogenes* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 113. p. 8502–8507.
- RONCATI, N.V., BACCARIN, R.Y.A., MASSOCO, C.O. & FERNANDES, W.R. (2011). Occurrence of congenital in *Theileria equi* Lusitano pure blood foals, diagnosed by RT-PCR. *Education Journal in Veterinary Medicine and Zootechny of CRMV-SP. São Paulo*. 9(1). p. 46–52.
- ROOD, J.I., ADAMS, V., LACEY, J., LYRAS, D., MCCLANE, B.A., MELVILLE, S.B., MOORE, R.J., POPOFF, M.R., SARKER, M.R., SONGER, J.G., UZAL, F.A. & VAN IMMERSEEL, F. (2018). Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe*. xxx. 1–6. *Article in press*.
- ROOS, T.B., MORAES, C.M., VIDOR, T., VENDRUSCOLO, C.T. & LEITE, F.P.L. (2009). Xantana como adjuvante em vacina contra herpes suíno tipo 1. *Veterinária em Foco*. 6(2). p. 154–158.
- SAADATIAN-ELAHI, M., HORSTICK, O., BREIMAN, R.F., GESSNER, B.D., GUBLER, D.J., LOUIS, J., PARASHAR, U.D., TAPIA, R., PICOT, V., ZINSOU, J.A. & NELSON, C.B. (2016). Beyond efficacy: The full public health impact of vaccines. *Vaccine*. 34(9). p. 1139–1147.
- SAIKH, K.U., KISSNER, T.L., NYSTROM, S., RUTHEL, G. & ULRICH, R.G. (2008). Interleukin-15 increases vaccine efficacy through a mechanism linked to dendritic cell maturation and enhanced antibody titers. *Clinical and Vaccine Immunology*. 15(1). P. 131–137.
- SCAMPARINI, A.R.P., DRUZIAN J.I., MALDONADE, I. & MARIUZZO D. (2000). New biopolymers produced by nitrogen fixing microorganisms for use in foods. In: K. Nishinari (ed.), *Hydrocolloids. Part 1: Physical Chemistry and Industrial Application of Gels, Polysaccharides and Proteins*. Osaka, Elsevier Science B.V., p. 169–178.
- SCHATZMAYR, H.G. (2003). New perspectives in viral vaccines. *História, Ciências, Saúde Manguinhos*. 10(2). p. 655–669.
- SCHEIN, E. (1988). Equine babesioses. In: RISTIC, M. (Ed.) *Babesiosis of domestic animals and man*. Florida: CRS Press. p. 197–208.
- SCHNEIDER, L. (2001). V Curso Extensivo de cosmetologia – Emulsões Cosméticas e Géis. *Instituto magistral*. Módulo III. p. 2–49.
- SCHUCH, R.A., OLIVEIRA, T.L., COLLARES, T.F., MONTE, L.G., INDA, G.R., DELLAGOSTIN, O.A., VENDRUSCOLO, C.T., MOREIRA, A.S. & HARTWIG, D.D. (2017). The use of xanthan gum as vaccine adjuvant: An evaluation of immunostimulatory potential in BALB/c mice and cytotoxicity in vitro. *BioMed Research International*. v. 2017.

- SCHWARZ, T.F., HORACEK, T., KNUF, M., DAMMAN, H.G., ROMAN, F., DRAMÉ M., GILLARD, P. & JILG, W. (2009). Single dose vaccination with AS03-adjuvanted H5N1 vaccines in a randomized trial induces strong and broad immune responsiveness to booster vaccination in adults. *Vaccine*. 27(45). p. 6284–6289.
- SEPPIC. (2018). Disponível em: <https://www.seppic.com/montanide-isa-w-o>. Acessado em: 11 de agosto de 2018.
- SEUBERT, A., MONACI, E., PIZZA, M., O'HAGAN, D.T. & WACK, A. (2008). The Adjuvants Aluminum Hydroxide and Differentiation toward Dendritic Cells Chemoattractants and Enhance Monocyte MF59 Induce Monocyte and Granulocyte. *The Journal of Immunology*. 180. p. 5402–5412.
- SILVA, M.G., GRAÇA, T., SUAREZ, C.E. & KNOWLES, D.P. (2013). Repertoire of *Theileria equi* immunodominant antigens bound by equine antibody. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 188. p.109–115.
- SILVA, R.O.S., OLIVEIRA Jr., C.A., GUEDES, R.M.C. & LOBATO, F.C.F. (2015). *Clostridium perfringens*: a review of the disease in pigs, horses and broiler chickens. *Ciência Rural*. 45(6). *On-line*.
- SMITH, K. (1988). Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science*. 240. p. 1169–1176.
- SOMMER, A. & FABRI, M. (2015). Vitamin D Regulates Cytokine Patterns Secreted by Dendritic Cells to Promote Differentiation of IL-22-Producing T Cells. *PLOS ONE*. 10(6): e013039
- SOUZA, A.S. & VENDRUSCOLO, C.T. (1999). Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *X. campestris* pv *pruni* CEPAS 24 e 28. *Ciência e Engenharia* 8(2). p. 115–120.
- SPICKLER, A.R. & ROTH, J.A. (2003). Adjuvants in Veterinary Vaccines: Modes of Action and Adverse Effects. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 17. p. 273–281.
- SPRIGGS, D.R. & KOFF, W.C. (1991). Topics in vaccines adjuvants research. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Florida.
- STANBERRY, L.R. & STRUGNELL, R. (2011). Vaccines of the future. *Understanding Modern Vaccines: Perspectives in Vaccinology*. 1. p. 151–199.
- STOKLASEK, T.A., SCHLUNS, K.S. & LEFRANCOIS, L. (2006). Combined IL-15/IL-15R{alpha} Immunotherapy Maximizes IL-15 Activity In Vivo. *Journal of Immunology*. 177. p. 6072–6080.
- STRUGNELL, R., ZEPP, F., CUNNINGHAM, A. & TANTAWICHIAN, T. (2011). Vaccine antigens. *Understanding Modern Vaccines: Perspectives in Vaccinology*. 1(1). p. 61–68
- SUTHERLAND, I.W. (2001). Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*. 11. p. 663–674.
- TAKEUCHI, A., KAMIRYOU, Y. & YAMADA ET AL., H. (2009). Oral administration of xanthan gum enhances antitumor activity through Toll like receptor 4. *International Immunopharmacology*. 9(13-14). p. 1562–1567.

TESTE DO IODO. Disponível em:

<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAenoEAL/extracao-caracterizacao-amido>. Acessado em: 07 de junho de 2018.

THAKUR, R., ANAND, R., TIWARI, S., SINGH, A.P., TIWARY, B.N. & SHANKAR, J. (2015). Cytokines induce effector T-helper cells during invasive aspergillosis; what we have learned about T-helper cells? *Frontiers in Microbiology*. 6. p. 429.

TRITTO, E., MOSCA, F. & de GREGORIO, E. (2009). Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *Vaccine*. 27. p. 3331–3334.

UILENBERG, G. (2006). *Babesia* – A historical overview. *Veterinary Parasitology*. 138. p. 3–10.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Supplemental Assay Method for Potency Testing *Clostridium perfringens* Type D Epsilon Antitoxins. Code of Federal Regulations. SAM 203.07, p. 1 de 11. Disponível em: https://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications/203.pdf. Acessado em: 22 de agosto de 2018.

VALKENBURGA, S.A., LIA, O.T.W., MAKKA, P.W.Y., MOKA, C.K.P., NICHOLLSB, J.M., GUANA, Y., WALDMANN, T.A., PEIRISA, J.S.M., PERERA, L.P. & POONA, L.L.M. (2014). IL-15 adjuvanted multivalent vaccinia-based universal influenza vaccine requires CD4+ T cells for heterosubtypic protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111(15). p. 5676–5681.

VENCO SAÚDE ANIMAL. Disponível em:

<http://www.vencofarma.web1475.kinghost.net/produto-detalle/80/lexington-8>. Acessado em: 28 de agosto de 2018.

VIANNA, A.M., GONÇALES, R.A., LARA, A.P.S.S., PINTO, L.S., NIZOLI, L.Q. & LEITE, F.P.L. (2014). Heterologous expression of EMA-2 (equi merozoite antigen) of *Theileria equi* in *Pichia pastoris* with potential use in immunobiologics. *Ciência Rural*. 44(10). P. 1830–1836.

WHO. World Health Organization. (2017). Disponível em:

<http://www.who.int/topics/vaccines/en/>. Acessado em: 31 de maio de 2018.

WISE, L.N., KAPMEYER, L.S., MEALEY, R.H. & KNOWLES, D.P. (2013). Review of Equine Piroplasmiasis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 27(6). on line.

WU, T.Y.H., SINGH, M., MILLER, A.T., D'ORO, U., SKIBINSKI, D.A.G., MBOW, M. L., BUFALI, S., HERMAN, A.E., CORTEZ, A., GREGORIO, E., DORO, F., LI, Y., NAYAK, B.P., TRITTO, E., FILIPPI, C.M., OTTEN, G.R., BRITO, L.A., MONACI, E., LI, C., APREA, S., VALENTINI, S., CALABRÓ, S., LAERA, D., BRUNELLI, B., CAPRONI, E., MALYALA, P., PANCHAL, R.G., WARREN, T.K., BAVARI, S., O'HAGAN, D.T., COOKE, M.P. & VALIANTE, N.M. (2014). Rational design of small molecules as vaccine adjuvants. *Science Translational Medicine*. 6(263). p. 263ra160.

YAO, W., KANG, J., KANG, L., GAO, S., YANG, H., JI, B., LI, P., LIU, J., XIN, W. & WANG, J. (2016). Immunization with a novel *Clostridium perfringens* epsilon toxin mutant rETX^{Y196E}-C confers strong protection in mice. *Scientific reports*. Disponível em: www.nature.com/scientificreports/. Acessado em: 7 de agosto de 2018.

- ZHANG, Y., WANG, H., REN, J., TANG, X., JING, Y., XING, D., ZHAO, G., YAO, Z., YANG, X. & BAI, H. (2012). IL-17A Synergizes with IFN- γ to Upregulate iNOS and NO Production and Inhibit Chlamydial Growth. *PLOS ONE*. 7:e39214.
- ZHENG, Z., ARÉVALO, D., GUAN, H. & ZENG, M. (2018). Noninvasive vaccination against infectious diseases. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 0(0). p. 1–17.
- ZRIOUAL, S., ECOCHARD, R., TOURNADRE, A., LENIEF, V., CAZALIS, M-A. & MIOSSEC, P. (2009). Genome-Wide Comparison between IL-17A- and IL-17F-Induced Effects in Human Rheumatoid Arthritis Synoviocytes. *Journal of Immunology*. 182. p. 3112–3120.
- ZOBBA, R., ARDU, M., NICCOLINI, S., CHESSA, B., MANNA, L., COCCO, R. & PARPAGLIA, M.L.P. (2008). Clinical and laboratory findings in equine piroplasmiasis. *Journal of Equine Veterinary Science*. 28. p.30–308.

8 ANEXOS



Pelotas, 28 de novembro de 2014

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA)

Para: Professor Fábio Pereira Leivas Leite
Centro de Desenvolvimento Tecnológico

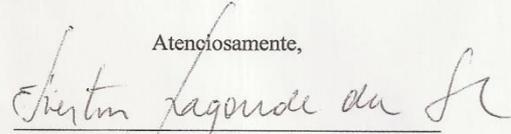
Senhor Professor:

A CEEA analisou o projeto intitulado: **“Emulsões de polissacarídeo bacteriano como adjuvantes em vacinas recombinantes”**, processo nº23110.009339/2014-33, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer e assiná-lo, reenviar o processo à CEEA. Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 9339-2014).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

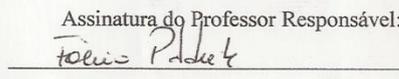
Atenciosamente,



Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva
Presidente da CEEA

Ciente em: 05 / 01 / 2014

Assinatura do Professor Responsável:





Delaware

IMPORTADORA QUÍMICA DELAWARE LTDA.

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Documento: N° 56210P3577L65/15

Data Emissão: 10/09/2015

Ordem de Fracionamento: 11436

		GOMA XANTANA	
Insumo	CHINA	Procedência	BRASIL
Origem		DCB	09628
Lote Interno	1134/15	CAS	11138-66-2
Fabricante	DEOSEN BIOCHEMICAL	Lote Fabricante	31150007
Data Fabricação	02/01/2015	Data Validade	01/01/2017

Análises Físico-Químicas

Testes	Especificações	Resultados
*Aspecto	Pó fino de cor creme	De acordo
*Solubilidade	Solúvel em água	De acordo
*Perda por Secagem (105 °C / 5 h)	Máximo 15,0 %	8,81 %
*pH (Solução a 1 %)	6,0 a 8,0	6,30
*Cinzas Totais	Máximo 13,0 %	4,99 %
Análises Realizadas pelo Fabricante		
Viscosidade (Solução a 1 %, em KCl 1 %)	1200 a 1600 cPs	1560 cPs
V1 . V2	1,02 a 1,45	1,03
Ácido Pirúvico	Mínimo 1,5 %	3,40 %
Chumbo	Máximo 2 ppm	< 2 ppm
Arsênico	Máximo 3 ppm	< 3 ppm
Metais Pesados	Máximo 20 ppm	< 20 ppm
Etanol	Máximo 500 ppm	53 ppm
Nitrogênio	Máximo 1,5 %	0,75 %
Tamanho da Partícula		
80 Mesh	100 % passa	100 %
200 Mesh	Mínimo 92 %	93 %

Análise Microbiológica

Testes	Especificações	Resultados
Contagem Total Bactérias	Máximo $2,0 \times 10^5$ UFC / g	< 50 UFC / g
Contagem Total de Fungos e Leveduras	Máximo $1,0 \times 10^4$ UFC / g	< 50 UFC / g
<i>Salmonella</i> sp.	Ausente em 1 g	Ausente
<i>Escherichia coli</i>	Ausente em 1 g	Ausente

Os resultados presentes neste Certificado de Análise tem seus valores restritos a este lote.

Referência Bibliográfica: Conforme literatura do fornecedor.

Conservação: Em recipientes herméticos, ao abrigo da luz, calor e umidade.

*Testes realizados em nosso Laboratório de Controle de Qualidade.

Resultado APROVADO

Edenisio da Silva Lisboa
Farmacêutico Responsável
CRF-RS 13382**CONTROLE DE QUALIDADE**RUA MORRETES, 376 - FONE/FAX: (51) 3341.0812 - CEP 91030-300 - SANTA MARIA GORETTI - PORTO ALEGRE - RS - BRASIL
E-mail: vendas@delaware.com.br