



Universidade Federal de Mato Grosso
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ADJUVANTE DO ÓLEO DE ARROZ (*ORYZA SATIVA* L.)
NA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR DE CAMUNDONGOS

Isabela Thommen Maciel Sartor

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos necessários para a obtenção do título
de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Deijanira Alves de Albuquerque
Co-Orientador: Prof. Dr. Edson Moleta Colodel

Cuiabá – MT
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

A transcrição de qualquer trecho desta dissertação será permitida desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Aluna: _____

Isabela Thommen Maciel Sartor.

Aprovada em / /

Bancada Examinadora:

1. Prof.^a Dr.^a Deijanira Alves de Albuquerque

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Assinatura: _____

2. Prof. Dr.

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Assinatura: _____

3. Prof. Dr.

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Assinatura: _____

4. Prof.^a Dr.

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Assinatura: _____

Dedicatória

A minha família: meus pais, Salvador e Beatrice, que me ensinaram a trilhar a vida com perseverança, honestidade e respeito ao próximo, e às minhas irmãs Thaíza e Trícia, pelo carinho e apoio, pois acreditaram que eu estava escolhendo o meu melhor caminho.

Ao Cleber, que no início deste trabalho era meu noivo e hoje meu esposo, pelo amor, carinho, dedicação e companheirismo recebidos todos os dias.

À Prof.^a Dr.^a Deijanira Alves de Albuquerque por ter aceitado me orientar na realização deste trabalho e, assim, me proporcionado desenvolvimento intelectual.

Agradecimento

A Deus, somente Sua força permitiu que eu continuasse a caminhada!

A Prof.^a Dr.^a Deijanira Alves de Albuquerque, que me acompanhou e apoiou durante a execução desta pesquisa, superando as dificuldades, contornando os obstáculos, porque sempre soube me mostrar a meta a ser atingida. Muito obrigada pela oportunidade de realizar o mestrado, pela amizade, ensinamentos, carinho, confiança e por ter sempre feito o possível e, muitas das vezes, o impossível para que todos os nossos planos se tornassem realidade.

Ao Dr. Vitor Valério Maffili, coordenador do Biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, por fornecer os animais utilizados nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Edson Moleta Colodel pela co-orientação e pelas análises histológicas.

Ao Manoel Luiz de Arruda, técnico em histologia do Laboratório de Histopatologia do HOVET-UFMT, pelo grandioso auxílio na montagem das lâminas de histologia.

À Secretaria de Administração de Estado/SAD e ao Instituto de Defesa do Estado de Mato Grosso/INDEA, do qual faço parte do quadro de servidor público estadual efetivo e concursado, pela formação da primeira Comissão de Qualificação do INDEA, conforme o decreto n.º 6.481, e por esta Comissão em conjunto com a SAD terem analisado o nosso projeto e julgado merecedor de concessão da Licença para qualificação profissional.

Aos professores Dr. Afonso Lodovico Sinkoc e Dr. Cor Jésus Fernandes Fontes, pelo aceite em participar de nossa banca examinadora, pelas críticas e sugestões para a defesa.

Ao prof. Dr. Cor Jésus Fernandes Fontes e seus orientando de mestrado em Ciências da Saúde, da Faculdade de Ciências Médicas, Naiana Fernandes Leotti e Ricardo Cruz, pelas leituras dos ELISA.

Ao Doutorando Daniel Pessina do Laboratório de Chagas Experimental, Autoimunidade e Imunologia Celular (LACEI), da Fiocruz, Salvador, Bahia, pelas dosagens de citocinas.

Às amigas Carla Amarante, Suize Oliveira e Fernanda Rocco, que sempre me alertaram para a importância do mestrado.

A todas as colegas da 1ª turma, formada apenas por mulheres, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária, pela convivência e aprendizado.

Aos inúmeros animais que deram suas vidas em contribuição à pesquisa.

“ O homem só envelhece quando nele os lamentos
substituem os sonhos.”

Jhon Barreymore.

Resumo

O desenvolvimento de novos adjuvantes para uso vacinas transformou-se num campo de pesquisa em expansão nos últimos trinta anos, devido à necessidade de gerar vacinas mais eficazes na indução de uma proteção de longa duração em seres humanos e em outros animais. Com o objetivo de avaliar a atividade adjuvante do óleo de arroz (*Oryza sativa* L.), no presente trabalho analisou-se sua capacidade adjuvante frente à resposta imune humoral e celular de camundongos imunizados com OVA emulsificada com óleo de arroz (OVA+RO). Para efeitos de comparação foram utilizados os adjuvantes incompleto e completo de Freund (IFA e CFA, respectivamente) ou OVA solúvel. Para avaliar a atividade adjuvante do óleo de arroz na resposta humoral foram realizados ensaios de produção e identificação de Ig, IgG1 e IgG2a anti-OVA, os quais foram determinados pela técnica de ELISA. A análise dos resultados revelou que, durante a resposta secundária, o óleo de arroz estimulou significativamente a produção de Ig e IgG1 comparada à resposta dos animais imunizados com OVA solúvel, porém com ação adjuvante inferior à do IFA. A subclasse IgG2a não foi detectada em nenhum dos grupos analisados. A atividade adjuvante na resposta celular foi avaliada através de um modelo de hipersensibilidade tardia (DTH) induzida em camundongos imunizados com OVA+RO. O óleo de arroz estimulou a DTH, porém com valores significativamente menores que o CFA. Além disso, na avaliação histológica, verificou-se que o óleo de arroz induziu a migração de linfócitos para o local da injeção, porém com efeitos adversos menos intensos do que os do IFA. Já a emulsão feita com óleo de arroz-PBS e administrada por via subcutânea manteve-se no espaço intersticial e dentro de macrófagos por pelo menos setenta e duas horas, quando foi feita a última análise. Em experimento *ex vivo*, não houve diferença nos níveis de IFN- γ , IL-4 e IL-10 produzidos por células do baço dos camundongos imunizados com OVA solúvel ou emulsificada com óleo de arroz ou IFA. O presente estudo contribuirá para a caracterização da atividade adjuvante do óleo de arroz que é biodegradável, seguro, de baixo custo, de fácil aquisição e com possibilidade de ser usado em vacinas profilática ou terapêuticas.

Abstract

The development of new adjuvants for use in vaccines became an expansive research field in the past thirty years due to the need to produce more effective vaccines to get a long and better protection for human beings and other animals. In order to evaluate the adjuvant activity of rice oil (*Oryza sativa* L.), in this work, it was analyzed the humoral and cellular immune response of mice immunized with OVA emulsified in rice oil (OVA+RO). For comparative purposes, incomplete and complete Freund's adjuvants (IFA and CFA) or soluble OVA were used. To evaluate the adjuvant activity of rice oil in the humoral response Ig, IgG1 and IgG2a were determined by ELISA. The results show that mice immunized with OVA+RO produced significantly higher amounts of Ig and IgG1 than animals injected with soluble OVA, however with lower adjuvant action comparing to IFA. The IgG2a subclass was not detected in any of the analyzed groups. The adjuvant activity of rice oil in cellular response was evaluated through a model of delayed type hypersensitivity (DTH) induced in mice immunized with OVA+RO. The rice oil stimulated the DTH, but with significant lower values than CFA. Besides, it was verified in the histological evaluation that rice oil induced the migration of lymphocytes to the injection sites, but with lower adverse effects than the ones caused by IFA. The rice oil-PBS emulsion administrated in the subcutaneous tissue remains at the interstitial space and inside of macrophages for at least 72 hours, when the last analysis was done. In *ex vivo* experiments there was no difference in IFN- γ , IL-4 and IL-10 levels produced by spleen cells from mice immunized with soluble OVA or OVA emulsified in rice oil or IFA. This work will contribute to characterize the adjuvant activity of rice oil, which is biodegradable, safe, has a low cost, is easy to acquire and possible to be used in therapeutic or protective vaccines.

LISTA DE ABREVIATURAS

% - por cento

® - marca registrada

°C - graus Celsius

α - alfa

β - beta

γ - gama

ml - mililitro

mm - milímetro

mM - milimolar

nm - nanômetro

μg - micrograma

μl - microlitro

Ac - anticorpo

Ag - antígeno

APC - célula apresentadora de antígeno

BSA - albumina bovina sérica

CD - "cluster of differentiation" (agrupamento de determinantes antigênicos característicos de leucócitos)

CD4+ - co-receptor presente em células T restritas ao MHC de classe II

CD8+ - co-receptor presente em células T restritas ao MHC de classe I

CFA - adjuvante completo de Freund

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CPMP - "Committee for Proprietary Medicinal Products" (Comitê de Especialidades Farmacêuticas / Agência Européia de Avaliação de Medicamentos)

DNA - ácido desoxirribonucléico

DO - densidade óptica

DTH - "delayed-type-hipersensitivity" (reação de hipersensibilidade do tipo tardia ou retardada)

ELISA - "enzyme-linked immunosorbent assay" (teste imunoenzimático)

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ - ácido sulfúrico

HIV - vírus da imunodeficiência humana
H & E - hematoxilina e eosina
IFA - adjuvante incompleto de Freund
IFN - interferon
Ig - imunoglobulinas
IgE - imunoglobulina da classe E
IgG1 - imunoglobulina da subclasse G1
IgG2a - imunoglobulina da subclasse G2a
IL-2 - interleucina 2
IL-4 - interleucina 4
IL-5 - interleucina 5
IL-10 - interleucina 10
IP - intraperitoneal
ISCOM - complexo imunoestimulante
LPS - lipopolissacarídeo
MDP - muramil dipeptídeo
MHC-I - complexo de histocompatibilidade maior de classe I
MHC-II - complexo de histocompatibilidade maior de classe II
NaCl - cloreto de sódio
OPD - ortho-phenyldiamine
OVA - ovalbumina
PBS - salina tamponada com fosfato
Quil A - saponina extraída da *Quillaja saponaria*
QS 21 - saponina isolada da *Quillaja saponaria*, fração solúvel em água
RPM - rotação por minuto
RO - "rice oil" (óleo de arroz)
SC - subcutânea
TC - célula T citotóxica
Th - "T help" (célula T auxiliar)
Th1 - "T help" 1 (célula T auxiliar do tipo 1)
Th2 - "T help" 2 (célula T auxiliar do tipo 2)
VLPs - "virus-like particles" (partículas víricas)

SUMÁRIO

	Páginas
1- Introdução.....	18
1.1 Adjuvantes em vacinas.....	19
1.2 Mecanismos de ação dos adjuvantes	20
1.3 Categorias de adjuvantes	21
A) Sais minerais	21
B) Compostos tensoativos	23
C) Adjuvantes derivados de microorganismos	23
D) Partículas antigênicas no sistema de “apresentação” de antígeno	23
E) Emulsões	24
1.4 Obtenção de novos adjuvantes: avanços e problemas.....	27
1.5 Sistema imune.....	29
2- Justificativa	32
3- Objetivo geral	33
3.1 Objetivos específicos	33
4- Material e métodos	34
4.1 Animais	34
4.2 Antígeno e adjuvantes	34
4.3 Preparo das emulsões para as imunizações dos camundongos	34
4.4 Teste de estabilidade da gotícula (“droplet test”)	35
4.5 Imunizações dos camundongos para produção de anticorpos anti-OVA....	36
4.6 Coleta das amostras de sangue	36
4.7 Quantificação de anticorpos séricos anti-OVA pelo ensaio imunoenzimático / ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”)	37
4.8 Avaliação da reação de hipersensibilidade tardia (DTH) para OVA	38

4.9	Análise histológica	39
4.10	Avaliação da deposição do óleo de arroz no local da injeção	39
4.11	Avaliação da produção de citocinas <i>ex vivo</i>	39
4.12	Análise estatística	40
5-	Resultados	41
5.1	Estimulação da produção de Ig anti-OVA pelo óleo de arroz	41
5.2	Padrão isotípico de anticorpos anti-OVA estimulados pelo óleo de arroz.....	42
5.3	Efeito de vias de administração sobre a produção de Ig anti-OVA	43
5.4	Avaliação da reação de hipersensibilidade tardia (DTH) para OVA	44
5.5	Avaliação histológica dos efeitos adversos provocados pelo óleo de arroz no local da injeção	45
5.6	Avaliação histológica do depósito do óleo de arroz no local da injeção.....	47
5.7	Avaliação da produção de citocinas	47
6-	Discussão.....	50
7-	Conclusões	54
8-	Referências bibliográficas	55
9-	Apêndices	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Distribuição dos grupos no delineamento experimental inteiramente casualizado e protocolo de imunização 36

Quadro 2: Esquema de coleta de sangue, imunização e desafio 37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: A) Corte transversal da região cervical de suíno mostrando a presença de granuloma vacinal; B) Corte histológico de um grande granuloma da lesão vacinal, contendo necrose central, onde pode ser observado o depósito de alumínio no tecido pela coloração azulada (coloração de solochrome azurine com vermelho counterstain neutro. Aumento 50x), perifericamente rodeado por um aro de macrófagos e de linfócitos (Fonte: VALTULINI et al., 2005) 22
- Figura 2: Granuloma na região cervical de bovino, de origem vacinal observada 40 dias pós-vacinação para febre aftosa com vacina oleosa, município de Santo Antônio do Leverger 26
- Figura 3: Instrumentos usados no preparo da emulsão 35
- Figura 4: Uma gotícula estável da OVA emulsificada com óleo de arroz 35
- Figura 5: Cinética da síntese de Ig anti-OVA estimulada pelo óleo de arroz em camundongos C57BL/6 imunizados por via subcutânea. Cada ponto (média \pm desvio padrão) corresponde à absorvância obtida a partir dos soros diluídos 500 vezes, sendo * $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA e • $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA+RO..... 41

Figura 6: Padrão isotípico de anticorpos anti-OVA estimulados pelo óleo de arroz em camundongos C57BL/6 imunizados por via subcutânea, subclasse IgG1 (A) e subclasse IgG2a (B). Cada ponto (média ± desvio padrão) corresponde à absorbância obtida a partir dos soros diluídos 2000 vezes, sendo * p< 0,05 em relação ao grupo OVA e ° p< 0,05 em relação ao grupo OVA+RO..... 42

Figura 7: Efeito das vias de administração sobre a produção de Ig anti-OVA em camundongos imunizados por via IP (A) ou por via SC (B). Cada ponto (média ± desvio padrão) corresponde à absorbância obtida a partir dos soros diluídos 500 vezes, sendo * p< 0,05 em relação ao grupo OVA e ° p< 0,05 em relação ao grupo OVA+RO e ° em relação às vias de administração do antígeno 43

Figura 8: Aumento específico da espessura dos coxins plantares de camundongos 24 horas após o desafio da DTH. Dados apresentados como média ± desvio padrão e ° p< 0,05 em relação ao grupo OVA+RO 44

Figura 9: Coxins plantares de camundongos. A) Coxim plantar normal (H & E, 200x). B) Coxim plantar de camundongo que recebeu injeção de OVA emulsificada com óleo de arroz. Áreas com vacúolos circundados por infiltrado mononuclear (setas duplas); setas tracejadas indicam presença de infiltrado inflamatório mononuclear na região perivascular (H & E, 200x); C) Coxim plantar de camundongo que recebeu injeção de OVA emulsificada com óleo de arroz, macrófagos contendo o citoplasma distendido e vacuolizado, dando um aspecto espumoso (“foam cell”) (H & E, 400x); D) Coxim plantar de camundongo que recebeu injeção de OVA emulsificada com IFA. Áreas de reação inflamatória granulomatosa difusa, com presença de vacúolos. Setas indicam áreas com extensa necrose coagulativa da fibra muscular (H & E, 40x); E) Coxim plantar de camundongo que recebeu injeção de OVA emulsificada com IFA, macrófagos contendo citoplasma distendido e com presença de macrovacúolos (setas) (H & E, 400x) 46

Figura 10: Coxins plantares de camundongos que receberam injeção de 25 µl de óleo de arroz emulsificados com 25 µl de PBS, em intervalos de 48 horas (A) e 72 horas (B). Setas indicam a presença de vacúolos (áreas com depósito do óleo) (H & E, 100x) 47

Figura 11: Produção de IFN- γ (A), IL-4 (B) e IL-10 (C) por células do baço de camundongos 48 horas após um segundo reforço de OVA solúvel por via SC ou IP. Os resultados representam a média \pm desvio padrão, sendo * $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA+IFA pela via IP..... 49

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Granuloma na região cervical de camundongo C57BL/6, local de imunização feita por via SC, 21º dia após a imunização com OVA emulsificada em IFA, o granuloma permaneceu ao longo dos 42 dias 61

Apêndice B - Foto feita no 5º dia após a imunização por via subcutânea na base da cauda dos camundongos. A) e B) Nota-se, macroscopicamente, a presença da emulsão em camundongos imunizados com OVA emulsificada em CFA (setas); C) camundongos imunizados com OVA emulsificada com óleo de arroz 61

1- Introdução

A vacinação pode ser definida como a atividade de imunização que promove aos humanos e a outros animais proteção contra uma determinada doença infecciosa. Não há dúvidas de que a vacinação foi uma das maiores intervenções mundiais no campo da saúde pública no século passado, reduz consideravelmente a mortalidade e a morbidade causadas por doenças infecciosas na população humana e em outros animais, promovendo um impacto global no quadro de crescimento populacional. Mesmo assim, diante desses avanços, a cada ano, no mundo, nascem 130 milhões de crianças que não tem acesso à vacinação (EHRETH, 2002; SCHIJNS, 2003).

Apesar dos comprovados benefícios econômicos e sociais das vacinas, a queda da prática intervencionista da vacinação está cada vez maior (MONSSONG, MULLER, 2000). Nos países industrializados, esse fato pode ser explicado, em parte, pelos órgãos responsáveis e até mesmo pela população em geral, por subestimarem tanto a gravidade das doenças infecciosas quanto os benefícios que a vacinação pode trazer para a prática de prevenção, tais como a economia nas despesas hospitalares por internação de pacientes infectados (BREIMAN, 2006).

O processo de erradicação das epidemias de varíola e poliomielite, consideradas na época um verdadeiro milagre, só foi possível graças a um trabalho de prevenção com vacinação em larga escala. Embora as vacinas salvem cerca de três milhões de crianças por ano, outros três milhões morrem de doenças para as quais há vacinas específicas, como hepatite B, sarampo, tétano e febre amarela. Seria possível diminuir essa incidência de mortalidade para mais da metade, se o uso das vacinas fosse corretamente intensificado, ou se os órgãos financiadores estimulassem novas pesquisas para a descoberta de vacinas que neutralizassem o impacto de outras doenças infecciosas, como a malária, dengue, doença de chagas, HIV e alguns tipos de câncer (BREIMAN, 2006).

A maioria das vacinas usadas atualmente ainda é produzida com patógenos atenuados ou inativados. No entanto, o risco da reversão de vírus atenuados para a forma selvagem em indivíduos imunocomprometidos e o desenvolvimento de reações de hipersensibilidade imediata em indivíduos susceptíveis têm exigido o desenvolvimento de novas vacinas, bem como o refinamento das vacinas já existentes, a fim de torná-las mais seguras e sem perda da eficácia. Além disso, a existência de doenças infecciosas crônicas e a emergência de novos patógenos

requerem o desenvolvimento de novas vacinas (MCNEELA, MILLS, 2001).

Avanços tecnológicos nas áreas de bioquímica, biologia molecular e imunologia têm possibilitado o desenvolvimento de peptídeos e subunidades, os quais são candidatos a serem usados em vacinas, que seriam mais seguras para uso em indivíduos normais, como nos imunocomprometidos. Todavia, peptídeos e subunidades de baixo peso molecular e altamente purificados são antígenos fracos e a aplicação dos mesmos em vacinas é limitada pelo desconhecimento de adjuvantes adequados, que potenciem a resposta imune a tais antígenos (SCHIJNS, 2003). Em contraste aos avanços rápidos obtidos pelo uso da tecnologia para a purificação de antígenos e apesar de ainda haver uma necessidade real da descoberta de novos adjuvantes, os estudos nessa área têm sido lentos e relativamente escassos. Para exemplificar, os adjuvantes à base de sais de alumínio foram descritos há mais de 70 anos e ainda são os únicos adjuvantes usados em vacinas produzidas nos Estados Unidos da América, tanto para uso em humanos como em outros animais (BREWER, 2006).

A opção pelo uso dos adjuvantes à base de sais de alumínio em vacinas tem sido feita mediante a segurança que essas substâncias têm mostrado ao longo do tempo, ou seja, os efeitos colaterais decorrentes do seu uso são aceitáveis como sendo pouco agressivos à saúde. Todavia, sabe-se que há várias limitações e desvantagens relacionadas ao uso de adjuvantes à base de sais de alumínio. Além disso, a peculiaridade de resposta imune protetora adequada aos diferentes patógenos implica na impossibilidade do estabelecimento de um adjuvante universal e apropriado para todas as vacinas (AUDIBERT, 2003; LENZO *et al.*, 2003).

1.1 Adjuvantes em vacinas

O termo adjuvante originou-se da palavra *adjuvare* que significa ajudar. Podem ser classificadas como adjuvantes as moléculas ou substâncias capazes de potencializar ou intensificar os eventos biológicos que compõem a resposta imune (SHIJNS, 2000).

O interesse de se estudar os adjuvantes é bem antigo. Desde 1925, diversas moléculas e substâncias vêm sendo estudadas com o objetivo de aumentar a resposta imune contra antígenos específicos. Dentre esses estudos, Ramon (1925),

demonstrou ser possível aumentar artificialmente os níveis das antitoxinas tetânicas e diftéricas, pela adição de substâncias adjuvantes nessas vacinas, tais como ágar, sais metálicos, óleo mineral, lecitina e saponina (RAMON, 1925 *apud* AUCOUTURIER, DUPUIS, GANNE, 2001).

Como resultado de uma variedade de estudos nos últimos oitenta anos, algumas formulações de adjuvantes foram desenvolvidas, sendo que poucas foram testadas em triagens clínicas e a maioria delas nunca foi aceita para o uso em vacinação, devido à toxicidade e aos efeitos adversos (GUPTA, SIBER, 1995).

1.2 Mecanismos de ação dos adjuvantes

Os adjuvantes representam numerosos compostos com larga variedade de conformação e que agem por diferentes caminhos. Na tentativa de elucidar o mecanismo de ação dos adjuvantes e tendo em vista a grande diversidade de substâncias dotadas de potencial adjuvante, várias são as propostas do mecanismo de ação frente ao sistema imune (AUDIBERT, LISE, 1993; ALVING, 2002).

Segundo Cox e Coulter (1997), os adjuvantes podem atuar em cinco caminhos:

- imunomodulação, que se refere à capacidade dos adjuvantes de modificar a rede de citocinas, promovendo a regulação do sistema imune como um todo, mas culminando em uma estimulação da secreção de certas citocinas e inibição de outras;

- apresentação, que se trata da capacidade do adjuvante de preservar a integridade do antígeno a ser apresentado às células imunes efetoras apropriadas, conferindo benefícios como: aumento dos níveis de anticorpos neutralizantes, interferência na afinidade dos anticorpos e influência na duração da resposta imune;

- indução de linfócitos T citotóxicos CD8⁺, que se refere à facilitação na incorporação ou na persistência de peptídeos apropriados dentro de moléculas MHC de classe I;

- “targeting”, que define a capacidade de um adjuvante de liberar o antígeno para as células efetoras (as células apresentadoras de antígeno - APCs); e

- o efeito depósito, o qual proporciona uma liberação prolongada do antígeno, podendo ser um depósito de curta duração (ex. sais de alumínio) e um depósito de longa duração (ex. emulsões de óleos e polímeros sintéticos).

Mesmo tendo a idéia dos caminhos, o mecanismo de ação de muitos adjuvantes permanece desconhecido, uma vez que a imunização ativa uma complexa cascata de eventos, dificultando o entendimento do efeito primário dos adjuvantes (SINGH, O'HAGAN, 2003).

1.3 Categorias de adjuvantes

A) Sais minerais

Desde 1926 até os dias atuais, os sais de alumínio, principalmente o hidróxido e o fosfato de alumínio, foram os adjuvantes mais usados em vacinas para humanos e para animais de interesse veterinário, devido ao grau de segurança e ao baixo custo (GLENNY et al., 1926 *apud* ALISSON, BYARS, 1991). Infelizmente, os sais de alumínio são adjuvantes relativamente pobres em muitas ações, particularmente em induzir as respostas imunes celulares, levando à ineficácia do seu uso em vacinas cuja resposta do tipo Th1 seja necessária para conferir proteção. Os mecanismos de ação dos sais de alumínio permanecem parcialmente desconhecidos, embora já se saiba que atuam na formação de um depósito do antígeno no local da injeção (BOMFORD, 1980; GUPTA, 1998; BREWER, 2006).

Valtulini *et al.* (2005) mostraram que vacinas para o uso em suínos, contendo adjuvante à base de hidróxido de alumínio, provocam o desenvolvimento de granulomas (Figura 1A). Todas as técnicas utilizadas para análise laboratorial das lesões nos suínos, ou seja, histologia, microanálise de raios-X e de absorção atômica, revelaram a presença de uma quantidade considerável de alumínio dentro e fora das células (Figura 1B). Esse achado, adicionado ao fato de que microorganismos não foram encontrados em análise histoquímica, leva a concluir que as lesões granulomatosas observadas nos suínos ocorreram pela presença do alumínio, provocando uma perda econômica devido à remoção de porções musculares.

Além da formação de granulomas localizados, em condição de função renal reduzida, o alumínio que permanece acumulado no corpo pode-se tornar tóxico. Os níveis elevados de alumínio no corpo afetam predominantemente tecidos do cérebro e dos ossos, que causam uma síndrome neurológica fatal e demência associada ao

distúrbio nervoso. A intoxicação pelo alumínio também está correlacionada ao potencial de desenvolvimento de esclerose amiotrófica e da doença de Alzheimer (GOTO *et al.*, 1993).

Além disso, há várias outras limitações e desvantagens relacionadas ao uso de adjuvantes à base de sais de alumínio tais como:

- ausência de estímulo da resposta celular, requerida para a proteção contra vírus e outros patógenos intracelulares (BOMFORD, 1980);
- ausência de estimulação da resposta humoral contra subunidades protéicas (GUPTA, 1998);
- estímulo forte da resposta Th2, com conseqüente estimulação da produção de IgE (COOPER, 1994; BAYLOR, EGAN, RICHMAN, 2002).
- presença de reações granulomatosas localizadas (MORRONI *et al.*, 1995).

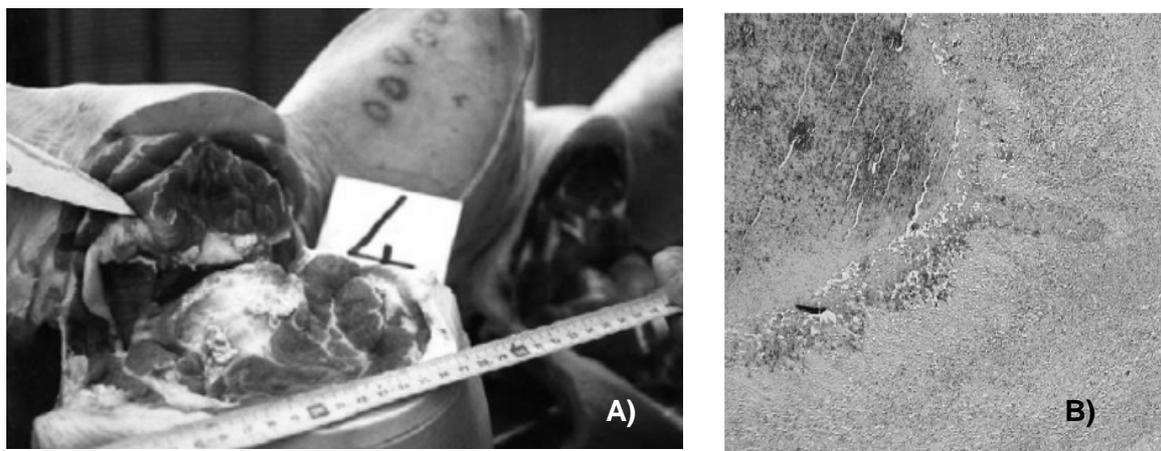


Figura 1: A) Corte transversal da região cervical de suíno mostrando a presença de granuloma vacinal; B) Corte histológico de um grande granuloma da lesão vacinal, contendo necrose central, onde pode ser observado o depósito de alumínio no tecido pela coloração azulada (coloração de solochrome azurine com vermelho counterstain neutro. Aumento 50x), perifericamente rodeado por um aro de macrófagos e de linfócitos (Fonte: VALTULINI *et al.*, 2005).

B) Compostos tensoativos

Um exemplo de composto tensoativo é o Quil-A, que é uma mistura de saponinas obtidas a partir de um extrato aquoso da *Quillaja saponaria*. O Quil-A é um produto natural composto de mais de 23 saponinas diferentes, sendo demasiadamente tóxico para o uso humano, pois promove a formação de reações locais severas, como a formação de granulomas. As frações desse extrato, purificadas por cromatografia de fase, promovem a obtenção do QS-21, o qual tem a habilidade de induzir respostas celulares fortes contra vários antígenos derivados de patógenos (ALISSON, BYARS, 1991; MBAWUIKE, ZANG, COUCH, 2007).

Por ser parcialmente purificado, o QS-21 apresentou-se menos tóxico do que Quil-A, porém ainda oferece os mesmos problemas, não sendo apropriado para o uso em vacinas profiláticas para humanos, à exceção das vacinas contra o câncer, quando uma toxicidade mais elevada pode ser aceita (RÖNNBERG, FEKADU, MOREIN, 1995).

C) Adjuvantes derivados de microorganismos

Devido à sua potente capacidade imunoestimulante, alguns componentes bacterianos ou fúngicos constituem uma fonte de potenciais adjuvantes. A parede bacteriana contém peptidoglicanos ou lipopolissacarídeos (LPS) que realçam a resposta imune, sendo sua atividade adjuvante mediada pela interação com receptores “Toll-like”, que captam os sinais de perigo para a ativação da defesa imune do hospedeiro. As espécies diferentes das bactérias usadas como uma fonte de adjuvantes incluem o *Mycobacterium spp.*, *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis* e *Neisseria meningitidis*. A principal atividade adjuvante dessas bactérias é mediada pelo N-acetil-muramilo-L-alanil-D-isoglutamato, chamado também de muramilo dipeptídeo (MDP). Em solução salina, o MDP estimula principalmente a imunidade humoral e, quando incorporado em lipossomos ou misturado com o glicerol, induz uma forte imunidade celular (AUDIBERT, LISE, 1993).

D) Partículas antigênicas no sistema de “apresentação” de antígeno

Diversos adjuvantes estudados podem ser incluídos na categoria de partículas

antigênicas no sistema de “apresentação” de antígeno, tais como: lipossomos, polímero de microesferas, nano-grânulos, complexo de imunoestimulação (ISCOMs) e partículas víricas (VLPs). Estes adjuvantes foram usados como suporte de subunidade de proteína e em vacinas de DNA. Porém, há um foco extensivo em compreender suas interações biológicas e o seu mecanismo de ação imunológico, o qual pode estar relacionado ao seu tamanho e à diversidade da natureza química do produto (AGUILAR, RODRIGUEZ, 2007).

E) Emulsões

O primeiro registro da utilização de emulsões de óleo em procedimentos de imunização foi relatado por Lê Moignic e Pinoy (1916) por meio da vacinação de camundongos com *Salmonella typhimurium* inativada e emulsificada com óleo mineral, sendo observado um aumento da resposta imune contra o antígeno (LÊ MOIGNIC, PINOY, 1916 *apud* MARCIANI, 2003).

No entanto, o conceito de adjuvante só foi desenvolvido posteriormente, quando Ramon (1925) demonstrou ser possível aumentar artificialmente os níveis de anticorpos contra as toxinas tetânicas e diftéricas pela adição de algumas substâncias na vacina, dentre elas um componente oleoso (RAMON, 1925 *apud* GUPTA, SIBER, 1995).

Em 1956, com a descoberta dos adjuvantes de Freund, o uso das emulsões em procedimentos de imunização tornou-se freqüente. O adjuvante completo de Freund (CFA), composto de óleo mineral e micobactérias mortas, é um dos mais potentes adjuvantes descritos para diversos antígenos. O CFA é usado extensamente em procedimentos experimentais com animais de laboratório, porém, em sua formulação original é bastante tóxico para uso em humanos. Um dos maiores problemas encontrados para vacinas com adjuvantes à base de óleo mineral é que o uso freqüente pode resultar em reações adversas indesejáveis, tais como a formação de granulomas e cistos. Muitos dos efeitos adversos dos adjuvantes completo e incompleto de Freund são creditados ao óleo mineral, pelo fato de não ser biodegradável, formando lesões ulcerativas no local da injeção (GUPTA *et al.*, 1993; MALAGA *et al.*, 2004).

O adjuvante incompleto de Freund é usado com sucesso em várias vacinas veterinárias, como a da febre aftosa e da influenza. Em humanos, foi empregado

principalmente na vacina contra poliomielite e parainfluenza (GUPTA *et al.*, 1993). Para o uso veterinário, emulsões são recomendadas para bovinos, pequenos ruminantes e aves (ACOUTURIER, DUPUIS, GANNE, 2001).

No caso da febre aftosa, emulsões contendo o óleo mineral podem proteger o bovino por um ano, enquanto que as formulações baseadas no hidróxido de alumínio requerem dois ou mais reforços (BAHNEMANN, MESQUITA, 1997). Estudos em caprinos, usando o montanide ISA 206 (adjuvante composto por óleo mineral e mannideoleate) em formulações de vacinas contra febre aftosa, mostraram que esse adjuvante à base de óleo mineral estimula uma resposta imune mais rápida e mais elevada do que a estimulada por formulações com o hidróxido de alumínio como adjuvante (PATIL *et al.*, 2002).

Com o incremento das exportações, o Brasil conseguiu aumentar significativamente a comercialização de produtos cárneos para o exterior. Nesse contexto e devido às exigências por parte dos países importadores, notadamente a Comunidade Européia, fez-se necessária a melhoria na qualidade dos insumos envolvidos na produção, destacando-se as vacinas. Contudo, ainda hoje, as reações inflamatórias oriundas da vacinação em bovinos (Figura 2) são causas de preocupação entre os criadores e empresários que atuam no segmento de carnes e derivados, em decorrência das significativas perdas econômicas devido à presença de extensos abscessos na musculatura (FRANÇA *et al.*, 2006).

No Brasil, Moro e Junqueira (1999), em um levantamento de lesões durante a inspeção na linha de abate realizada em frigoríficos, relataram a ocorrência de 68,6% de animais com lesões por reação vacinal ou medicamentosa, havendo a necessidade da remoção de 1.112,79 kg de carne de um total de 4.000 bovinos examinados, que resultaram em uma média de 0,278 kg de carne removida por animal. Sendo estimada uma perda anual no Brasil de US\$ 11,3 milhões ocorrida na inspeção sanitária da linha de abate de bovinos.

Assim, ainda se faz necessário refletir sobre o manejo dos animais a serem vacinados, a composição e a via de aplicação desses insumos, visando diminuir a frequência dessas lesões e, conseqüentemente, a depreciação da carcaça (FRANÇA *et al.*, 2006).



Figura 2: Granuloma na região cervical de bovino, origem vacinal, observado 40 dias pós-vacinação para febre aftosa com vacina oleosa, município de Santo Antônio do Leverger.

Hilleman *et al.* (1966), relataram os primeiros estudos utilizando óleos vegetais como imunoadjuvante, com a formulação denominada de adjuvante 65, que consistia em 86% de óleo de amendoim, 10% de Arlacel A (surfactante) e 4% de monoesterato de alumínio. O efeito adjuvante dessa emulsão foi confirmado, sendo posteriormente indicado para uso em vacina experimental contra gripe em seres humanos e animais (HILLEMANN *et al.*, 1966 *apud*. REYNOLDS *et al.*, 1980).

Eghafona (1996) relatou a realização de imunizações em macacos, com vacinas contra o sarampo com vírus vivo atenuado e vírus inativado, na presença ou na ausência de adjuvantes, como o CFA, o IFA e os óleos de amendoim e coco. Esse estudo mostrou que os óleos de amendoim e coco apresentaram capacidade adjuvante comparável à do CFA e do IFA sobre a resposta imune humoral e celular.

Estudos mais recentes mostraram que os óleos de amendoim, algodão, milho, soja, arroz e o azeite de oliva formam emulsões estáveis de água em óleo e estimulam a produção de anticorpos contra ovalbumina em camundongos da linhagem Swiss (SILVA *et al.*, 2001; Mota, 2006). Já foi também mostrado que, diferentemente do óleo mineral, o óleo de arroz induz a migração de poucos eosinófilos para o local de sua injeção (MOTA, 2006). Essa resposta inflamatória causada pelo óleo de arroz no local da injeção pode estar relacionada à sua ação

antioxidante, devido à presença do gama-orizanol e do tocotrienoleno (vitamina E), que reduzem os níveis de colesterol plasmático e apresentam atividade antioxidante (GRAF, EATON, 1993).

A formação de emulsões estáveis de óleo em água sugere que os óleos acima citados, os quais são de origem vegetal e usados na alimentação humana, possam estimular a resposta imune por serem capazes de reter o antígeno no local da injeção, possibilitando assim a utilização de óleos vegetais como adjuvantes.

1.4 Obtenções de novos adjuvantes: avanços e problemas

Os estudos para a obtenção de novos adjuvantes são fundamentais, uma vez que os adjuvantes desempenham um papel crucial para determinação da magnitude e direção da resposta imune pelos diversos mecanismos, incluindo aumento da apresentação do antígeno, captação, distribuição e seletividade do alvo (SESARDIC, DOBBELAER, 2004).

Com o objetivo de tornar os estudos sobre adjuvantes mais homogêneos, em 1997, o “Committee for Proprietary Medicinal Products” (CPMP) formulou o Guia para Testes Pré-clínicos, Farmacêutico e Toxicológico de Vacinas, descrevendo os principais requisitos na abordagem do desenvolvimento de vacinas. No que se relaciona aos adjuvantes sugere-se que a substância candidata deva:

- demonstrar a compatibilidade com os antígenos da vacina;
- apresentar adsorção estável e eficaz;
- ter toxicidade aceitável;
- ter informações em estudo comparativo no modelo animal apropriado;
- ter sido avaliado no perfil de segurança da combinação antígeno-adjuvante; e
- ter sido avaliado no perfil de segurança da via de administração escolhida.

Para o estudo de novos adjuvantes, tem sido sugerido um modelo que utiliza um antígeno-padrão, como a ovalbumina ou a hemaglutinina do *Haemophilus influenza* (ALISSON, BYARS, 1991).

Segundo Sesardic e Dobbelaer (2004), para avaliar a toxicidade dos adjuvantes, devem ser observados os seguintes parâmetros farmacológicos e toxicológicos:

- a observação de reações no local da injeção;
- febre ou outros efeitos sistêmicos, incluindo aqueles mediados pelo sistema imune;
- teratogenicidade;
- genotoxicidade;
- efeitos adjuvantes na resposta imune;
- estudo da reação de hipersensibilidade para toxicidade de doses repetidas; e
- estudo de distribuição corporal do adjuvante.

Mesmo com o desenvolvimento de potentes formulações adjuvantes nos últimos anos, os sais de alumínio continuam sendo os mais usados rotineiramente nas vacinas para humanos. Alguns problemas podem ser citados durante o processo de obtenção de adjuvantes para vacinas, como adjuvantividade limitada, modelos animais apropriados e problemas com os testes experimentais. A adjuvantividade limitada ocorre pelo fato de alguns adjuvantes serem eficazes para determinados antígenos e ineficazes para outros. Um obstáculo maior para o desenvolvimento de novos adjuvantes é a toxicidade, a qual tem restringido a liberação e o uso de novos adjuvantes. O balanço entre segurança e efeitos adversos é avaliado diferentemente para uma vacina profilática e para uma vacina terapêutica. No primeiro caso, apenas os adjuvantes que causam efeitos adversos mínimos são aceitos, já para o uso terapêutico, são aceitáveis níveis de efeitos adversos mais elevados (GUPTA, 1998; GUPTA, SIBER, 1995; O'HAGAN, MACKICHAN, SINGH, 2001).

As regras do desenvolvimento de adjuvantes para o uso em seres humanos são mais rigorosas do que aquelas aplicadas às vacinas de uso veterinário. Além dos estudos pré-clínico dos próprios adjuvantes, a formulação combinada do antígeno-adjuvante requer também avaliação toxicológica para as experimentações clínicas. A toxicologia pré-clínica é normalmente testada em espécie animal pequena, tal como camundongos ou coelhos, pela mesma via da administração proposta para o uso humano, com dose e frequência de vacinação similar ou em doses mais alta (DURVERGER *et al.*, 2006).

Infelizmente, a ação de um adjuvante potente está correlacionada freqüentemente com o aumento da sua toxicidade. Portanto, o principal desafio na pesquisa de novos adjuvantes gira em torno da minimização de sua toxicidade para os organismos (AUDIBERT, 2003).

1.5 Sistema imune

O sistema imune é uma entidade biológica altamente dinâmica. Em consequência disso, a resposta imune observada nos organismos superiores é, na verdade, produto de um longo período de interação entre os seres vivos. Por esta razão, é importante conceber a idéia de que organismos e moléculas novas são selecionados a todo o momento, bem como os próprios seres vivos são selecionados por esses organismos e moléculas. Desta maneira, impõe-se à resposta imune uma elevada variabilidade, a qual pode ser observada através da adoção de diferentes estratégias, muitas simultâneas e, sistematicamente direcionadas com o propósito de obter uma situação de equilíbrio. Esse amplo espectro de resposta foi e sempre será determinante à sobrevivência das espécies (JANEWAY, TRAVERS, SHLOMCHIK, 2002).

O sistema imunológico é constituído por células e moléculas altamente especializadas no combate aos agentes infecciosos, havendo dois tipos fundamentais de resposta imune: a inata (ou natural) e a adaptativa, sendo a diferença básica entre essas duas categorias, a maneira pela qual reconhecem os antígenos (FEARON, LOCKSLEY, 1996). A resposta inata ocorre sem exigir uma prévia exposição ao agente infeccioso, enquanto a resposta adaptativa lança mão da produção de anticorpos e/ou ativação de linfócitos T contra um determinado agente e é adquirida durante a vida de um indivíduo como reação adaptativa à presença de patógenos específicos (DELVES, ROITT, 2000).

Tanto a imunidade inata como a adaptativa dependem da atividade de células brancas do sangue, ou seja, os leucócitos. A imunidade inata é mediada, principalmente, por granulócitos e macrófagos. Os macrófagos de humanos e de outros vertebrados parecem ter evoluído de células fagocitárias de animais mais simples e atuam como células apresentadoras de antígeno, muitas vezes utilizando-se de receptores presentes na superfície de sua membrana, para interagir com antígenos, microrganismos ou outras células. Já as respostas adaptativas são mediadas por linfócitos B e T, que proporcionam a imunidade duradoura (AUGER, ROSS, 1992; JANEWAY, TRAVERS, SHLOMCHIK, 2002; MANZ *et al.*, 2005).

Enquanto a resposta imune inata é rápida, mas dotada de baixa especificidade, a

resposta imune adaptativa é precisa, embora necessite de alguns dias ou semanas para se desenvolver, mesmo no caso de exposições subseqüentes, que culminam numa resposta adquirida mais rápida e vigorosa, sem contudo ser imediata (PARKIN, COHEN, 2001).

Historicamente, a imunidade adaptativa pode ser dividida em humoral e celular. A imunidade humoral é mediada pelos linfócitos B, que secretam anticorpos antígenos-específicos, com a função de neutralizar e eliminar patógenos extracelulares e suas toxinas (ESSER *et al.*, 2003). Depois da infecção ou imunização intencional, anticorpos antígenos-específicos de alta afinidade podem ser detectados no sangue por períodos longos, aumentando o tempo de vida individual daquele que foi imunizado. Os níveis desses anticorpos no soro são mantidos mesmo em aparente ausência do antígeno. Essa memória humoral pode proteger efetivamente contra reinfecção (MANZ *et al.*, 2005).

A imunidade celular é mediada tanto pelos linfócitos T auxiliares (“helper”) (Th), quanto pelos linfócitos T citotóxicos (Tc), que carregam em suas superfícies moléculas CD4+ ou CD8+, respectivamente. As células Th CD4+ são as orquestrantes da resposta imune, reconhecendo antígenos exógenos e ativando outros caminhos da resposta imune mediada por células, a fim de erradicar o patógeno. As células T CD8+ eliminam as células-alvo que apresentam fragmentos antigênicos, ligados às moléculas MHC de classe I (DELVES, ROITT, 2000).

As células Th CD4+ reconhecem antígenos ligados às moléculas MHC de classe II. Após serem ativadas, as células Th CD4+ podem ser divididas em duas subpopulações, células Th1 e células Th2, que surgem de um precursor Th0 e são diferenciadas de acordo com suas funções e as citocinas que produzem, pois morfologicamente são indistinguíveis. Contudo, a resposta gerada é muito diferente. As células Th1 produzem a interleucina (IL)-2, que induz a proliferação das células T, incluindo aquelas células CD4+ da resposta autócrina. A IL-2 também estimula a divisão das células T CD8+ e sua citotoxicidade. Outra citocina produzida pelas células Th1 é o interferon-gama (IFN- γ), responsável pela imunidade mediada por células, tais como a hipersensibilidade do tipo tardia, ativação de macrófagos e células inflamatórias que eliminam patógenos intracelulares, como as micobactérias, fungos, protozoários e ainda, induzem a citotoxicidade das células “natural killer”. Portanto, as citocinas produzidas pelas células Th1, são as principais responsáveis

pela indução da resposta inflamatória (PARKIN, COHEN, 2001).

Existe um “feedback” positivo que se refere ao fato do IFN- γ estimular as células Th0 a diferenciarem em células Th1 e, ao mesmo tempo, inibindo a diferenciação de células Th2. A resposta Th1 é essencial no controle da replicação de patógenos intracelulares, mas possivelmente contribui na patogênese de doenças autoimunes como a artrite reumatóide e a esclerose múltipla. As células Th2, por sua vez, produzem IL-4, IL-5 e IL-10, que favorecem a produção de anticorpos da subclasse IgG1 e da classe IgE. A IL-4 também promove um “feedback” positivo ao favorecer a indução da resposta Th2 e suprimir a diferenciação de células Th1 (DELVES, ROITT, 2000; PARKIN, COHEN, 2001).

Em caso de vacinação, a imunidade inata e a adaptativa agem em conjunto para ativar e executar a resposta imune. No entanto, a resposta imune adaptativa promove ao hospedeiro uma resposta antígeno específica e memória imunológica, enquanto a resposta imune inata não apresenta essa capacidade (ESSER *et al.*, 2003).

2- Justificativa

Grandes avanços na bioquímica e na biologia molecular têm sido direcionados para a identificação e produção de antígenos formados de sub-unidades cada vez mais purificados, candidatos a serem utilizados em vacinas. A redução de antígenos a sub-unidades provoca uma queda na imunogenicidade e a aplicação prática dos mesmos em vacinas continua sendo limitada pela falta de adjuvantes capazes de aumentar a resposta imune para esses imunógenos fracos. Em contraste com a rápida evolução mencionada para os antígenos e apesar de haver a necessidade crescente de descobertas de novos adjuvantes, os estudos nessa área têm sido mais lentos, tendo em vista o histórico da utilização de sais de alumínio e do óleo mineral como adjuvantes há quase um século.

Em um estudo recente foi mostrado que o óleo de arroz forma emulsão estável de água em óleo e estimula a produção de Ig anti-OVA em camundongos Swiss (Mota, 2006). Porém, não foi demonstrado se o óleo de arroz apresenta estímulo sobre a produção de diferentes isotipos de anticorpos anti-OVA, nem se a emulsão feita a partir do óleo de arroz com OVA permanece retida no local da injeção.

Como a descrição de adjuvantes ainda é uma etapa limitante para o desenvolvimento de vacinas compostas por antígenos de baixo peso molecular, esta proposta está formulada de acordo com a relevância do estudo sobre novos adjuvantes; tendo sido formulado conforme o Guia para Testes Pré-clínicos, Farmacêutico e Toxicológico de Vacinas do “Committee for Proprietary Medicinal Products” (1997), visa contribuir com a descrição de um novo adjuvante oleoso, formado única e exclusivamente pelo óleo de arroz que, associado ao valioso fato de ser biodegradável e utilizado na alimentação humana, apresenta propriedades que lhe conferem um potencial efeito adjuvante na resposta imune.

3- Objetivo geral

- Avaliar a atividade adjuvante do óleo de arroz (*Oryza sativa* L.) em um sistema com resposta imune celular e num outro com resposta predominantemente humoral, comparando com os adjuvantes oleosos clássicos: adjuvante completo e incompleto de Freund.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade adjuvante do óleo de arroz (*Oryza sativa* L.) sobre a resposta imune humoral, por meio da imunização de camundongos da linhagem C57BL/6, com o emprego da ovalbumina (OVA, antígeno-padrão solúvel) para a produção de anticorpos anti-OVA;

- Verificar a capacidade do óleo de arroz em modular o padrão isotípico de anticorpos anti-OVA (IgG1 e IgG2a);

- Comparar o efeito das vias de administração (SC x IP) sobre a atividade adjuvante na produção de anticorpos anti-OVA;

- Avaliar a atividade adjuvante do óleo de arroz (*Oryza sativa* L.) sobre a resposta imune celular, em um modelo de estudo da resposta de hipersensibilidade tardia (DTH), usando a ovalbumina emulsificada com o respectivo óleo;

- Avaliar histologicamente os efeitos adversos provocados no local da injeção do óleo de arroz nas primeiras 24 horas, bem como verificar o efeito depósito nas 72 horas após a injeção;

- Avaliar a produção de citocinas (IFN- γ , IL-4 e IL-10) por células dos baços de camundongos imunizados com OVA solúvel ou emulsificada com óleo de arroz ou com IFA.

4- Material e métodos

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6, machos com 9 semanas de idade, provenientes da FIOCRUZ, Salvador, Bahia. Os animais foram mantidos no laboratório de Imunologia, do Departamento de Ciências Básicas em Saúde, da Faculdade de Ciências Médicas da UFMT, sob regime alimentar conveniente, submetidos ao controle artificial de fotoperíodo de 12 horas e temperatura $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. A manipulação dos animais, antes e durante os ensaios, esteve de acordo com as regras de cuidados de animais de laboratório (NIH publ. n.º 86-23) e com os princípios da ética de experimentação animal (COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

4. 2 Antígeno e adjuvantes

Foi utilizado como antígeno padrão a ovalbumina (OVA, albumina de clara de ovo, grau V, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). E como adjuvantes foram usados o óleo de arroz comestível, obtido comercialmente (BLUE VILLE®); e como adjuvantes oleosos clássicos à base de óleo mineral os adjuvantes completo de Freund (CFA, Sigma®) e incompleto de Freund (IFA, Sigma®).

4. 3 Preparo das emulsões para as imunizações dos camundongos

Para as imunizações, as emulsões foram feitas de ovalbumina dissolvida em salina apirogênica (NaCl 0,15 M), emulsificada com o óleo de arroz ou com os adjuvantes completo ou incompleto de Freund. As emulsões foram feitas na proporção de 1:1, sendo os volumes iguais de óleo (100 μl) e da solução de OVA (100 μl). As emulsões foram misturadas manualmente como o auxílio de seringas conectadas a um “three way” (conector de três vias, Figura 3).



Figura 3: Instrumentos usados no preparo das emulsões.

4.4 Teste de estabilidade da gotícula (“droplet test”)

A estabilidade das emulsões foi testada conforme descrito por Moncada *et al.* (1993) e foram consideradas adequadas para imunizações quando gotejadas em água destilada gelada não se dispersaram por período de até 2 minutos (Figura 4).

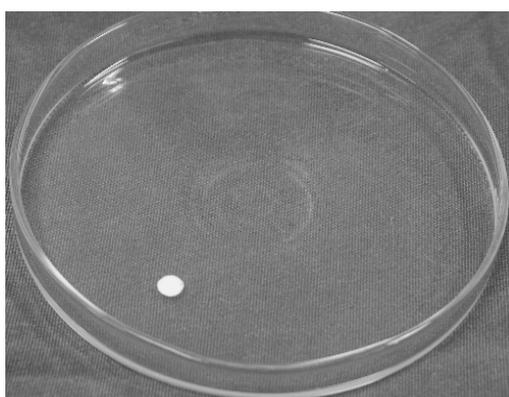


Figura 4: Uma gotícula estável da OVA emulsificada com óleo de arroz.

4.5 Imunizações dos camundongos para produção de anticorpos anti-OVA

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em seis grupos, com quatro camundongos por grupo, sendo três grupos imunizados por via subcutânea (SC, na região dorsal cervical) e outros três grupos imunizados por via intraperitoneal (IP). As imunizações foram feitas no dia zero com 10 µg de OVA solúvel ou emulsificada com óleo de arroz ou com adjuvante incompleto de Freund. O volume injetado em cada animal foi de 0,2 ml (Quadro 1).

Protocolo de Imunização	
Grupo	Imunização por via subcutânea
1	10 µg de OVA em 0,2 ml de solução salina
2	10 µg de OVA em 0,1 ml de solução salina + 0,1 ml de óleo de arroz
3	10 µg de OVA em 0,1 ml de solução salina + 0,1 ml de IFA

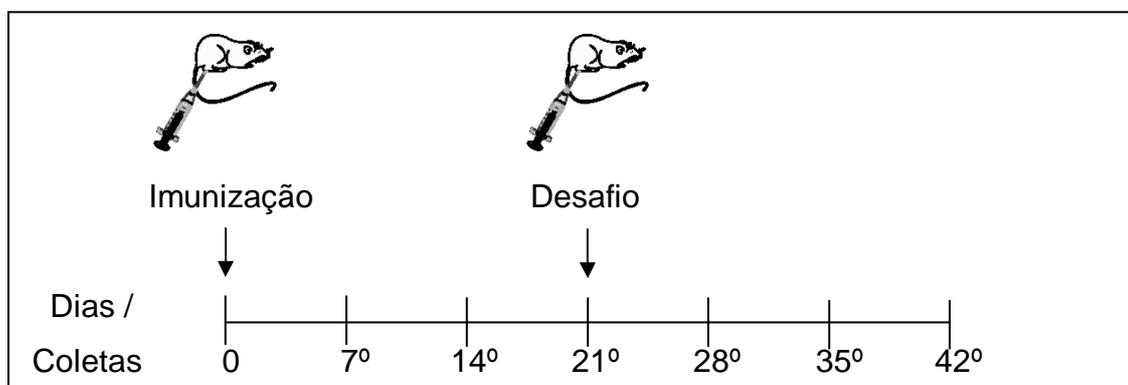
Protocolo de Imunização	
Grupo	Imunização por via intraperitoneal
4	10 µg de OVA em 0,2 ml de solução salina
5	10 µg de OVA em 0,1 ml de solução salina + 0,1 ml de óleo de arroz
6	10 µg de OVA em 0,1 ml de solução salina + 0,1 ml de IFA

Quadro 1: Distribuição dos grupos no delineamento experimental inteiramente casualizado e protocolo de imunização.

4.6 Coleta das amostras de sangue

Com o auxílio de pipetas Pasteur as amostras de sangue dos animais foram coletadas individualmente por punção no plexo retro-orbital dos camundongos, nos dias zero, 7, 14, 21, 28, 35 e 42. O sangue coletado foi armazenado em tubos cônicos do tipo “eppendorf” permanecendo em repouso por 2 horas à temperatura ambiente para retração do coágulo. Após esse tempo, o soro foi separado do coágulo por centrifugação a 2.000 RPM por 20 minutos, obtendo-se o soro límpido e livre de hemácias, sendo esse devidamente identificado e armazenado a -20°C para posterior análise da presença de anticorpos específicos para OVA. Após a coleta de sangue do dia 21, foi feito um desafio em todos os camundongos com apenas 10 µg

de OVA em 0,2 ml de solução salina, pelas mesmas vias de imunização do protocolo de imunização, ou seja, três grupos receberam OVA por via subcutânea e outros três grupos receberam-na por via intraperitoneal (Quadro 2).



Quadro 2: Esquema de coleta de sangue, imunização e desafio.

4.7 Quantificação de anticorpos séricos anti-OVA pelo ensaio imunoenzimático / ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”)

A presença de anticorpos específicos para um antígeno pode ser detectada pelo emprego de diferentes ensaios. Alguns medem a ligação direta do anticorpo ao seu antígeno, sendo estes ensaios baseados em interações primárias, como é o caso do ELISA (VENKATESAN, WALEKIN, 1993). Os soros obtidos dos animais imunizados com OVA emulsificada ou não com óleo de arroz ou IFA foram analisados por ELISA, a fim de pesquisar-se a presença de Ig anti-OVA, bem como das subclasses IgG1 e IgG2a. Para tanto, placas de microtitulação foram revestidas com 50 µl de solução de OVA a 10 µg/mL em salina tamponada com fosfato (PBS) e incubadas por 16 horas a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo Tween-20 a 0,05% (PBS-Tween) e as ligações inespecíficas foram bloqueadas com albumina sérica bovina a 2% em PBS (BSA-PBS) durante 1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida, o excesso de BSA-PBS foi descartado e foram adicionados os soros a serem testados, um soro normal, como controle negativo, um soro hiperimune como controle positivo, sendo as placas novamente incubadas durante uma noite a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS-Tween e adicionado um anticorpo monoclonal anti-Ig, (PharMingen®)

conjugado com peroxidase. A discriminação das subclasses IgG1 e IgG2a foi feita usando anticorpos monoclonais específicos para as cadeias pesadas gama1 e gama 2a, respectivamente (PharMingen®). As placas foram novamente incubadas por 1 hora à temperatura ambiente, lavadas 6 vezes com PBS-Tween e a reação Ag-Ac revelada pela adição de água oxigenada (H₂O₂), como substrato da peroxidase, e do cromógeno OPD (ortho-phenyldiamine). As placas foram incubadas por 15 minutos, à temperatura ambiente, e a reação enzima-substrato foi interrompida pela adição de 20 µL de H₂SO₄ 2 N por poço e a absorbância, a 490nm, foi determinada em leitor de microplacas de ELISA (leitora automática modelo 680 Microplate Reader, Bio-Rad® Laboratories). Os resultados são mostrados como a média ± desvio padrão da absorbância obtida a partir dos soros diluídos.

4.8 Avaliação da reação de hipersensibilidade tardia (DTH) para OVA

Para a indução da hipersensibilidade tardia à OVA, foi imunizado um grupo de camundongos por via subcutânea na base da cauda com 20 µg de OVA dissolvida em 100 µL de PBS e emulsificada com 100 µL de óleo de arroz. Para efeitos de comparação outro grupo de animais foi imunizado com 20 µg de OVA dissolvida em 100 µL de PBS e emulsificada com 100 µL de CFA. As imunizações foram feitas com 200 µL de cada emulsão por animal. Decorridos quatro dias após a imunização, a reação de DTH foi desencadeada pela injeção, subcutânea no coxim plantar direito de cada camundongo, de 20 µg de OVA dissolvida em 25 µL de PBS e emulsificada com 25 µl de óleo de arroz ou de IFA. O coxim plantar do membro contralateral serviu como controle e foi injetado com uma emulsão feita com 25 µl de óleo de arroz ou de IFA emulsificados com 25 µl de PBS, sem acrescentar a OVA (antígeno). A expressão da reação de DTH foi avaliada 24 horas após o desafio da DTH, através da medida do coxim plantar com o auxílio de um especímetro (Mitutoyo Ltd. Tokyo, Japan) e os resultados foram calculados pela subtração da espessura do coxim plantar direito menos a espessura do coxim contralateral.

4.9 Análise histológica

Após a avaliação da DTH, os animais foram sacrificados e os membros posteriores coletados para avaliação histológica dos efeitos adversos provocados nas primeiras 24 horas após a injeção de OVA emulsificada com óleo de arroz ou com IFA nos respectivos coxins, através da técnica de coloração de hematoxilina e eosina (H & E). A avaliação histológica foi feita no Laboratório de Patologia Veterinária da UFMT.

4.10 Avaliação da deposição do óleo de arroz no local da injeção

Para avaliar a deposição do óleo de arroz, um grupo de camundongos recebeu uma injeção de 25 µl de óleo de arroz emulsificados com 25 µl de PSB nos coxins plantares dos membros posteriores. Os animais foram sacrificados nos tempos de 48 e 72 horas após a injeção e os membros posteriores coletados para avaliação histológica da retenção da emulsão do óleo de arroz no local da injeção.

4.11 Avaliação da produção de citocinas *ex vivo*

Os camundongos que haviam sido imunizados por via subcutânea ou intraperitonal (Quadro 1) receberam um reforço com 10 µg de OVA solúvel no 42º dia (após a última coleta de sangue) e foram sacrificados 2 dias depois. Os baços foram coletados e macerados individualmente em meio de cultivo de células (Nutricel®), a fim de se obter uma suspensão de células. Em seguida, as suspensões celulares foram depositadas em “eppendorf” e centrifugadas a 1.000 RPM durante 5 minutos, e os sobrenadantes límpidos foram avaliados por ELISA no Laboratório de Chagas Experimental, Autoimunidade e Imunologia Celular (LACEI), da Fiocruz, Salvador, Bahia, usando-se pares de anticorpos monoclonais e citocinas recombinantes adquiridos da PharMingen®, para verificar a presença de IL-4, IL-10 e IFN-γ.

4.12 Análise estatística

Para a realização da análise estatística dos dados e a construção dos gráficos foi utilizado o software Graph-Pad Instat. Os resultados foram expressos com a média \pm desvio padrão. A análise comparativa dos parâmetros representados por valores numéricos entre os grupos foi realizada usando o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para comparar os dados entre e dentro dos grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), com o uso do teste Tukey. As diferenças foram consideradas significativas com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

5- Resultados

5.1 Estimulação da produção de Ig anti-OVA pelo óleo de arroz

Os resultados apresentados na Figura 5 mostram que, na resposta primária (7, 14 e 21 dias), os níveis de Ig anti-OVA produzidos pelos animais imunizados, por via subcutânea, com OVA emulsificada com o óleo de arroz foram similares àqueles produzidos pelos camundongos sensibilizados com OVA solúvel. Após o reforço, feito no 21º dia, o óleo de arroz estimulou significativamente a produção de Ig anti-OVA comparada àquela obtida de animais imunizados com OVA solúvel ($p < 0,05$). Por outro lado, os níveis de Ig anti-OVA estimulados pelo óleo de arroz foram significativamente menores que os estimulados pelo adjuvante incompleto de Freund ($p < 0,05$) durante o mesmo período.

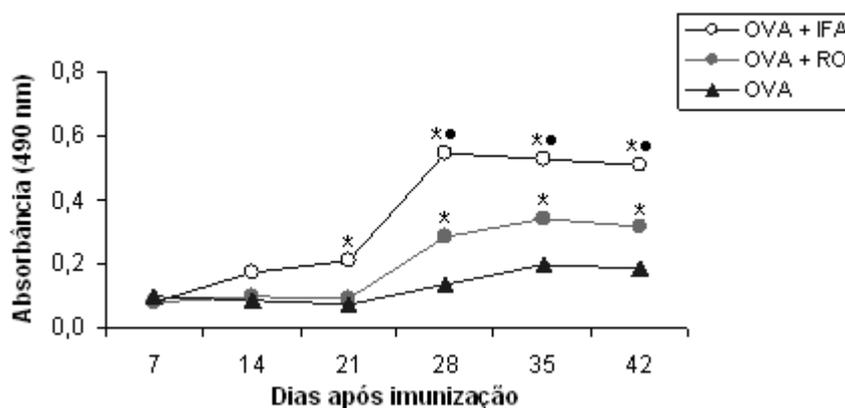


Figura 5: Cinética da síntese de Ig anti-OVA estimulada pelo óleo de arroz em camundongos C57BL/6 imunizados por via subcutânea. Cada ponto (média \pm desvio padrão) corresponde à absorbância obtida a partir dos soros diluídos 500 vezes, sendo * $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA e * $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA+RO.

5.2 Padrão isotípico de anticorpos anti-OVA estimulados pelo óleo de arroz

Os dados mostram que o óleo de arroz estimulou preferencialmente a síntese de anticorpos da subclasse de IgG1 nos camundongos imunizados por via subcutânea, apresentando resultados significativamente maiores que os camundongos imunizados com OVA solúvel ($p < 0,05$) após o desafio feito no 21º dia (Figura 6A). Porém, os níveis de IgG1 estimulados pelo óleo de arroz foram significativamente menores que os estimulados pelo IFA nos camundongos imunizados com OVA emulsificada com IFA ($p < 0,05$). A subclasse IgG2a não foi detectada nos soros analisados até seis semanas após a imunização inicial (Figura 6B).

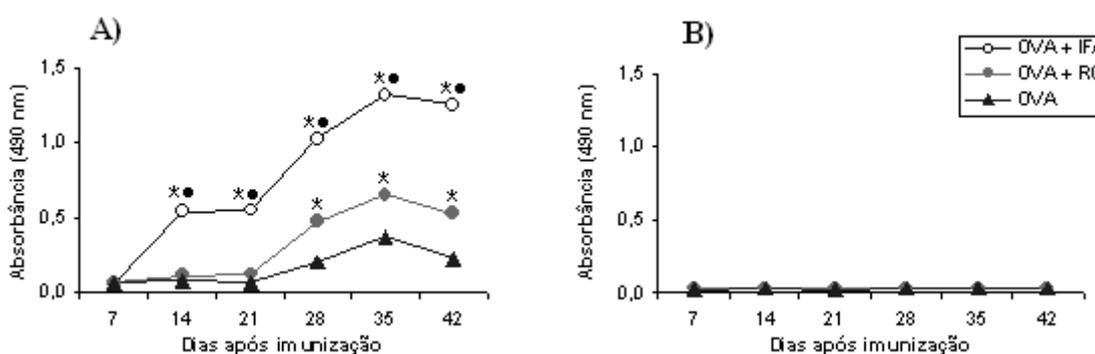


Figura 6: Padrão isotípico de anticorpos anti-OVA estimulados pelo óleo de arroz em camundongos C57BL/6 imunizados por via subcutânea, subclasse IgG1 (A) soros diluídos 2000 vezes e subclasse IgG2a (B) soros diluídos 500 vezes. Cada ponto (média \pm desvio padrão) corresponde à absorbância obtida a partir da diluição dos soros, sendo * $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA e • $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA+RO.

5.3 Efeito de vias de administração sobre a produção de Ig anti-OVA

Para avaliar o efeito de vias de administração do antígeno sobre a produção de anticorpos, camundongos foram imunizados por via subcutânea ou intraperitoneal (Quadro 1). Como mostram os resultados, animais imunizados com OVA emulsificada com óleo de arroz apresentaram diferenças significativas entre a via intraperitoneal e subcutânea sobre a produção de anticorpos no 42º dia após a imunização. Diferenças significativas entre a via intraperitoneal e subcutânea sobre a produção de anticorpos foram observadas em camundongos imunizados com OVA emulsificada com IFA durante o período do 14º até o 21º dia após a imunização e para os imunizados com OVA solúvel apenas no 28º dia após a imunização (Figuras 7A e 7B).

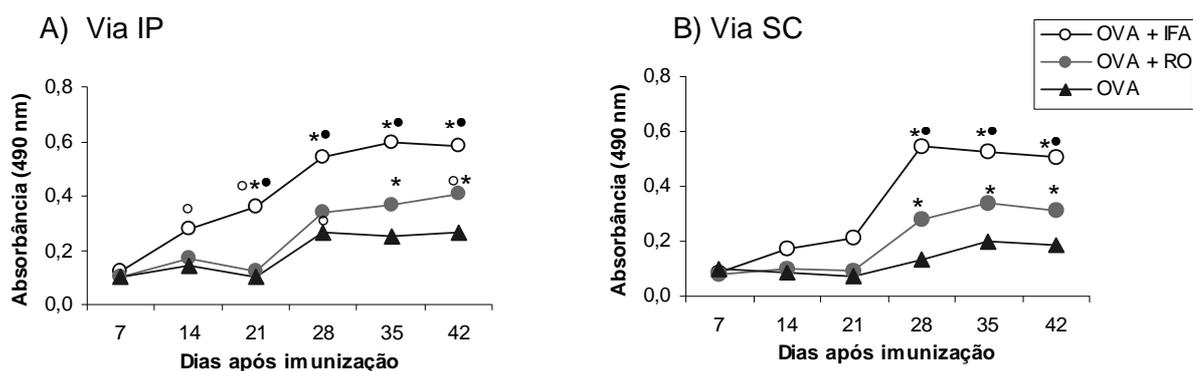


Figura 7: Efeito das vias de administração sobre a produção de Ig anti-OVA em camundongos imunizados por via IP (A) ou por via SC (B). Cada ponto (média \pm desvio padrão) corresponde à absorbância obtida a partir dos soros diluídos 500 vezes, sendo * $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA e ° $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA+RO e ° $p < 0,05$ em relação às vias de administração do antígeno.

5.4 Avaliação da reação de hipersensibilidade tardia (DTH) para OVA

Os resultados mostram que tanto CFA como o óleo de arroz estimularam uma DTH positiva, e os valores encontrados para o grupo de animais imunizados com OVA+CFA e desafiado com OVA+IFA foram significativamente superiores aos dos camundongos sensibilizados e desafiados com OVA+RO ($p < 0,05$) (Figura 8).

Durante o experimento, observou-se que os coxins injetados com OVA emulsificada com RO ou IFA apresentaram um aumento na sensibilidade dolorosa, vermelhidão e edema, sendo este edema mais pronunciado nos coxins dos animais injetados com OVA+IFA. Foi também verificado que os camundongos injetados com OVA+IFA no coxim plantar apresentaram uma redução da ingestão de água e ração, fato este decorrente do desconforto em permanecer com as patas traseiras apoiadas no piso das gaiolas, indicando a presença de dor aguda gerada pelo intenso edema das patas.

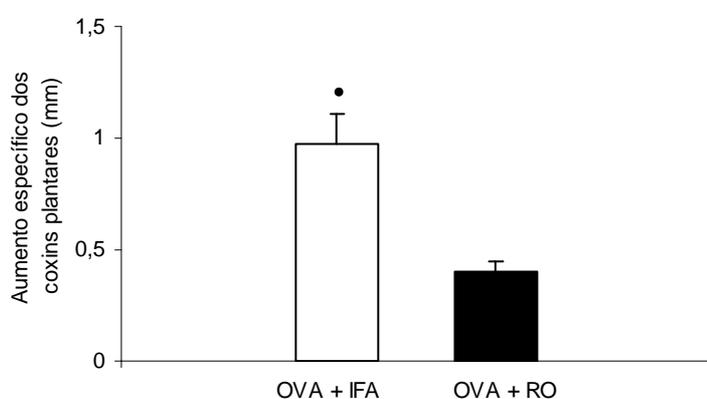


Figura 8: Aumento específico da espessura dos coxins plantares de camundongos 24 horas após o desafio da DTH. Dados apresentados como média \pm desvio padrão e * $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA+RO.

5.5 Avaliação histológica dos efeitos adversos provocados pelo óleo de arroz no local da injeção

A Figura 9A mostra um corte histológico do coxim plantar sem alterações. A avaliação histológica dos coxins plantares de camundongos injetados com OVA emulsificada com óleo de arroz mostra um edema no tecido dermal e sub-dermal, com presença de vacúolos de tamanhos variáveis contendo células epitelióides nas bordas (sendo os vacúolos associados com depósito da emulsão OVA+RO no local da injeção). Verificou-se também áreas com reação inflamatória granulomatosa multifocal e áreas com infiltrado inflamatório misto, predominantemente mononuclear, sendo observada a presença de linfócitos, neutrófilos, macrófagos e poucos eosinófilos. No tecido muscular subdermal nota-se discreta necrose coagulativa com hialinização, tumefação e vacuolização de fibras musculares e infiltrado inflamatório mononuclear perivascular (Figura 9B). Na Figura 9C observa-se um grande número de macrófagos contendo o citoplasma distendido e vacuolizado, dando um aspecto espumoso (“foam cell”, provavelmente pela fagocitose do óleo biodegradável contido na emulsão OVA+RO).

Os efeitos adversos ocorridos nas primeiras 24 horas após a injeção de OVA emulsificada com IFA podem ser observados nas Figuras 9D e 9E. Na avaliação histológica foi observado um edema de tecido dermal e sub-dermal com reação inflamatória granulomatosa difusa (reação inflamatória de maior intensidade em comparação à reação provocada pelo óleo de arroz), com infiltrado inflamatório misto, predominantemente mononuclear, sendo observada a presença de linfócitos, neutrófilos, macrófagos e eosinófilo no infiltrado inflamatório. Nota-se também a presença de vacúolos espalhados por todo o tecido (de uma extremidade a outra do corte histológico), associados como áreas mais extensas de necrose coagulativa com hialinização, tumefação e vacuolização de fibras musculares, associada com infiltrado de células mononucleares nas faces musculares e entre as fibras musculares. Na Figura 9E foi observada a presença de macrovacúolos no interior do citoplasma dos macrófagos (“foam cell”, provavelmente devido à presença do óleo mineral) e um número maior de eosinófilos no infiltrado inflamatório.

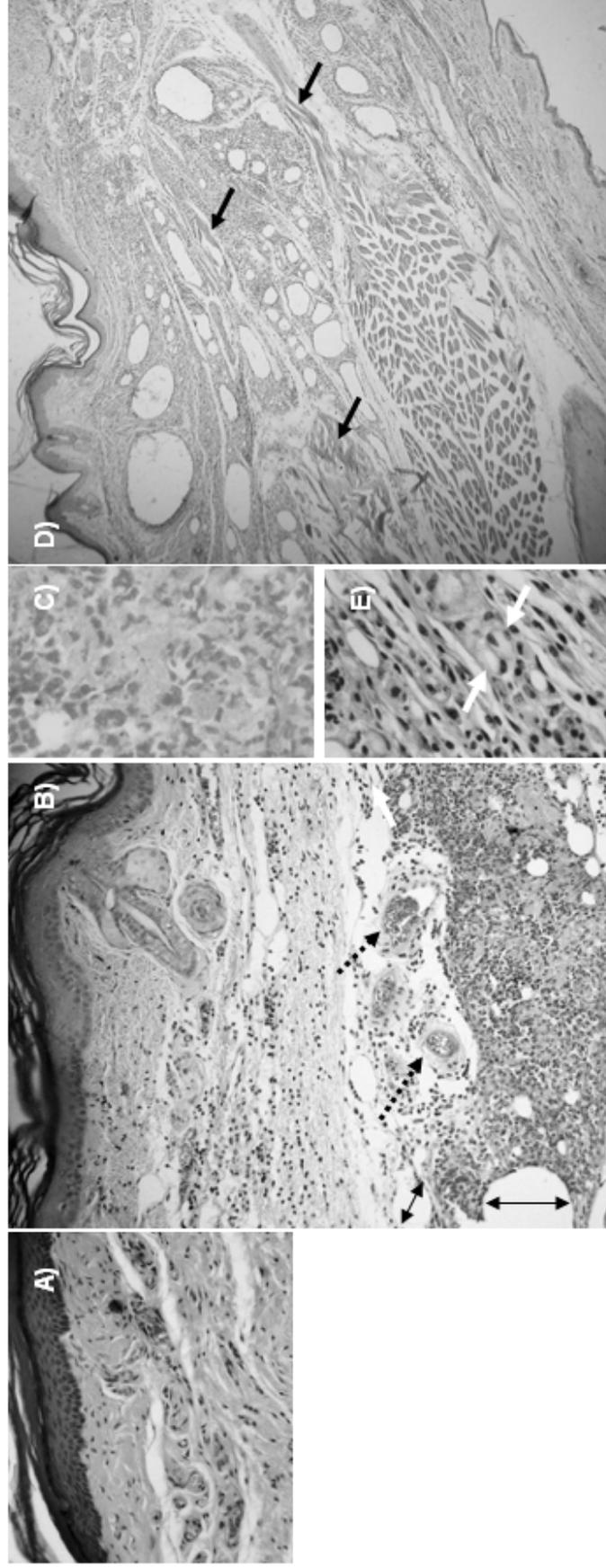


Figura 9: Coxins plantares de camundongos. A) Coxim plantar normal (H & E, 200x). B) Coxim plantar de camundongo que recebeu injeção de OVA emulsificada com óleo de arroz. Áreas com vacúolos circundadas por infiltrado mononuclear (setas duplas); setas tracejadas indicam presença de infiltrado inflamatório mononuclear na região perivascular (H & E, 200x); C) Coxim plantar de camundongo que recebeu injeção de OVA emulsificada com óleo de arroz, macrófagos contendo o citoplasma distendido e vacuolizado, dando um aspecto espumoso (“foam cell”) (H & E, 400x); D) Coxim plantar de camundongo que recebeu injeção de OVA emulsificada com IFA. Áreas de reação inflamatória granulomatosa difusa, com presença de vacúolos. Setas indicam áreas com extensa necrose coagulativa da fibra muscular (H & E, 40x); E) Coxim plantar de camundongo que recebeu injeção de OVA emulsificada com IFA, macrófagos contendo citoplasma distendido e com presença de macrovacúolos (setas) (H & E, 400x).

5.6 Avaliação histológica do depósito do óleo de arroz no local da injeção

Quanto ao depósito do óleo de arroz no local de injeção, observou-se a presença da emulsão desse óleo nas 48 e 72 horas após a injeção de 25 μ l de óleo de arroz emulsificados com 25 μ l de PBS nos coxins plantares de camundongos (Figuras 10A e 10B).

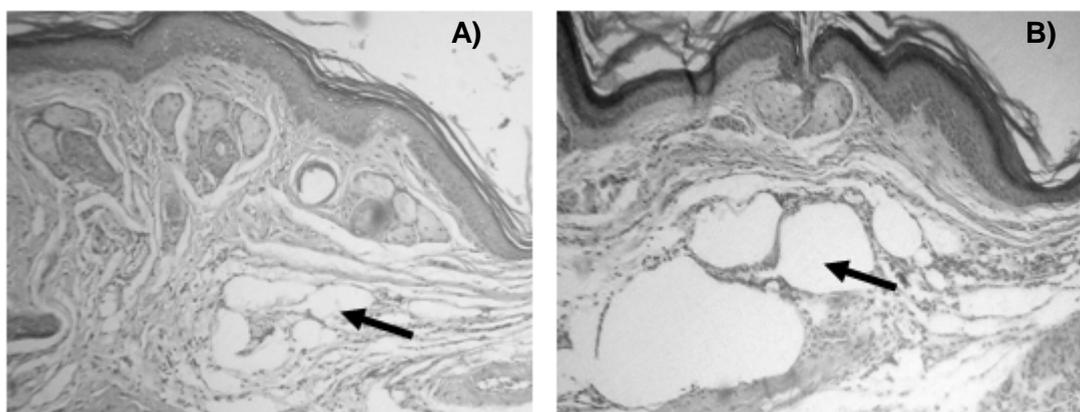


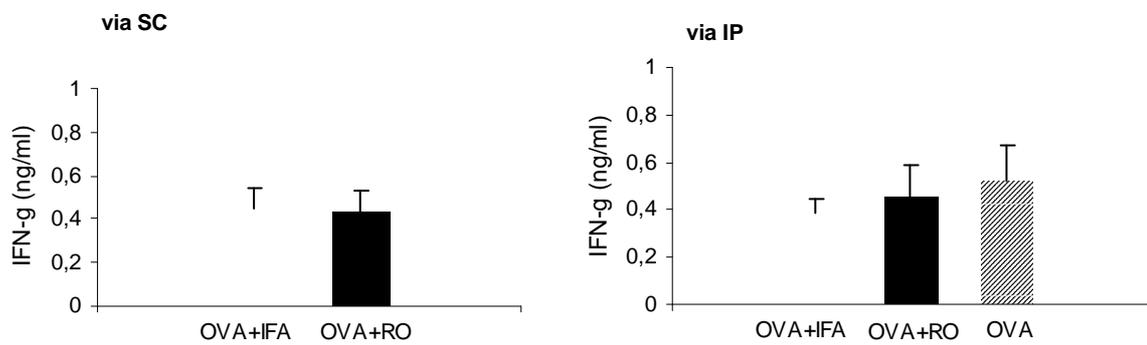
Figura 10: Coxins plantares de camundongos que receberam injeção de 25 μ l de óleo de arroz emulsificados com 25 μ l de PBS, em intervalos de 48 horas (A) e 72 horas (B). Setas indicam a presença de vacúolos (áreas com depósito do óleo) (H & E, 100x).

5.7 Avaliação da produção de citocinas

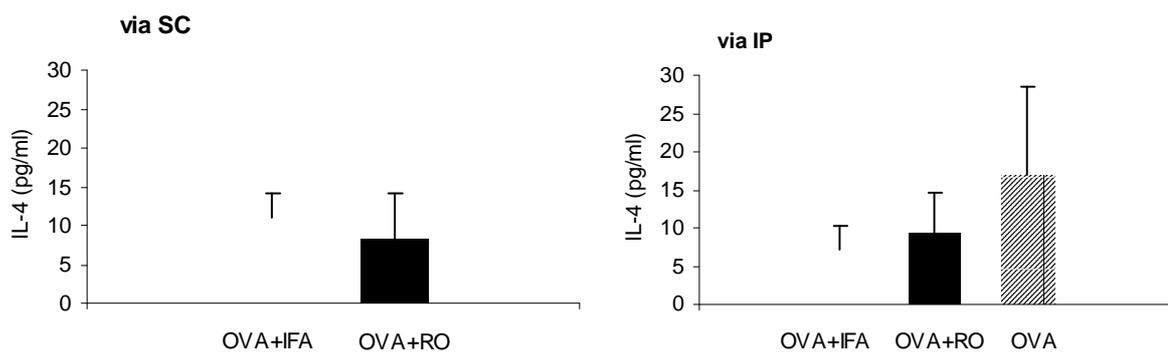
Na Figura 11 estão apresentados os resultados da quantificação, por ELISA, da produção de IFN- γ (A), IL-4 (B) e IL-10 (C) por células do baço dos camundongos, 48 horas após um segundo reforço de OVA solúvel (modelo *ex vivo*). Ao serem comparados os valores das citocinas, não foram observados diferenças significativas

entre os grupos (OVA+RO, OVA+IFA e OVA) para os níveis de IFN- γ , IL-4 e IL-10 entre camundongos imunizados por via subcutânea. Por outro lado, os camundongos imunizados por via intraperitoneal com OVA+IFA apresentaram níveis de IL-10 significativamente menores ($p < 0,05$) do que os animais imunizados com OVA solúvel ou OVA emulsificada com óleo de arroz.

A) IFN- γ (ng/mL)



B) IL-4 (pg/mL)



C) IL- 10 (ng/mL)

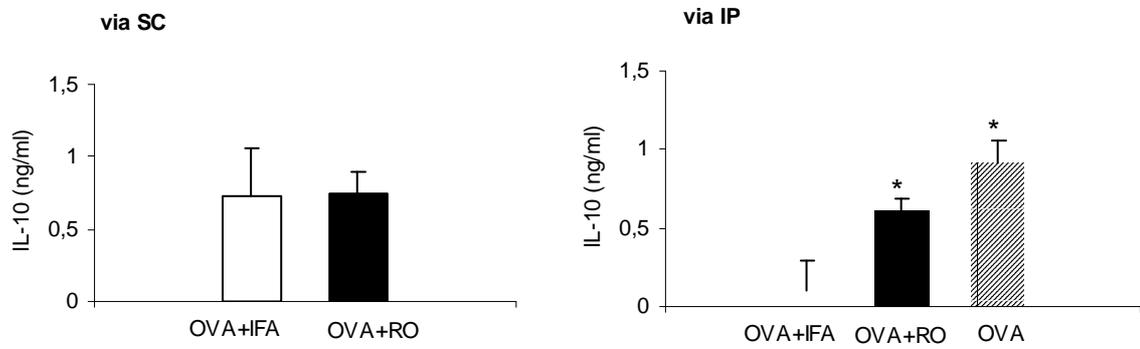


Figura 11: Produção de IFN- γ (A), IL-4 (B) e IL-10 (C) por células do baço de camundongos 48 horas após um segundo reforço de OVA solúvel por via SC ou IP. Os resultados representam a média \pm desvio padrão, sendo * $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA+IFA por via IP.

6- Discussão

Em relação à resposta primária, período da imunização até o desafio (dia zero ao 21º dia), os dados mostraram que não ocorreram diferenças no estímulo da síntese de anticorpos anti-OVA em animais imunizados com OVA solúvel ou emulsificada com óleo de arroz ou com IFA. Por outro lado, os resultados obtidos na resposta secundária (após o desafio) mostram que o óleo de arroz estimulou significativamente a produção de anticorpos anti-OVA comparada à dos animais imunizados com OVA solúvel. Contudo, o efeito adjuvante do óleo de arroz foi menor do que o do IFA. Segundo Mota (2006), não houve diferença na produção de anticorpos durante a resposta secundária em camundongos Swiss imunizados com OVA+RO ou com OVA+IFA. As diferenças entre os resultados do presente estudo e os mostrados por Mota (2006) podem ser atribuídas aos diferentes protocolos de imunização, pois no presente estudo foi feito um desafio com o antígeno solúvel no 21º dia após as imunizações, enquanto Mota (2006) fez reforços com a presença dos respectivos adjuvantes nos dias 14º e 28º após as imunizações.

Sabe-se que antígenos purificados, como a ovalbumina, quando injetados na forma solúvel são rapidamente degradados e removidos do local da injeção, induzindo uma resposta imune fraca e transitória (SCHIJNS, 2002). Todavia, quando esses antígenos estão associados a adjuvantes oleosos, como os adjuvantes de Freund, as emulsões ficam retidas no local da injeção formando um depósito de antígeno que é liberado em pequenas quantidades e por um período de tempo mais longo, ocasionando uma ativação sustentada das células T e uma imunidade mais efetiva (COX, COULTER, 1997; HILTON *et al.*, 1997; MARCIANI, 2003).

A avaliação do padrão isotípico de anticorpos anti-OVA mostrou uma seletividade na produção de anticorpos da subclasse IgG1 nos animais imunizados com OVA emulsificada com óleo de arroz, apresentando diferença significativamente superior durante a resposta secundária em comparação com os camundongos imunizados com OVA solúvel ($p < 0,05$). Entretanto, camundongos imunizados com OVA emulsificada com IFA apresentaram um aumento significativo na produção de anticorpos da subclasse IgG1 já na resposta primária em comparação aos demais grupos. Ao longo do experimento, não foram detectados anticorpos da subclasse IgG2a no soro dos animais imunizados com OVA solúvel ou emulsificada com óleo

de arroz ou IFA. Dados da literatura mostram que imunizações feitas em camundongos com um antígeno em presença de adjuvantes clássicos, como o gel de hidróxido de alumínio e adjuvante completo de Freund, estimulam a produção de diferentes isotipos de imunoglobulinas. Assim, o gel de hidróxido de alumínio estimula preferencialmente a síntese de IgG1 e o adjuvante completo de Freund estimula tanto IgG1 como IgG2a (BREWER *et al.*, 1996).

Para a avaliação do efeito adjuvante do óleo de arroz na resposta imune celular, foi usado um modelo de hipersensibilidade tardia (DTH) induzida por ovalbumina em camundongos, visto que a DTH é uma manifestação *in vivo* da resposta imune medida por células. A hipersensibilidade tardia é uma reação inflamatória decorrente da ativação de linfócitos T específicos para o antígeno. São necessárias 24 a 72 horas para o desenvolvimento da reação inflamatória do tipo hipersensibilidade tardia (DTH), sendo reconhecida pela mediação celular, nomeadamente linfócitos T, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. As manifestações clínicas de uma DTH positiva consistem em edema, eritema e endurecimento devido aos fenômenos vasculares e infiltração maciça por leucócitos (GOLSBY *et al.*, 2001). No presente estudo foi observada uma DTH positiva para a OVA emulsificada com óleo de arroz, porém significativamente inferior à DTH induzida quando a OVA foi emulsificada com adjuvante completo de Freund, concordando com Hernandez e colaboradores (2005), os quais demonstraram que combinações variadas de antígeno-adjuvante podem diferir na indução de DTH em bovinos. Os resultados foram divergentes dos obtidos por Eghafona (1996) em estudos com óleo vegetal, nos quais nenhuma reação de DTH foi notada com o uso dos óleos de amendoim ou coco em macacos (*Erhynchocbus patas*), fato esse que pode ser atribuído a diferenças imunológicas entre as espécies.

Analisando-se histologicamente os efeitos adversos provocados no local da injeção, foi observada a presença de infiltrado inflamatório de células mononucleares dispostas ao redor das emulsões nos coxins dos camundongos que receberam o antígeno emulsificado com o óleo de arroz, bem como nos que receberam o antígeno emulsificado com óleo mineral, demonstrando que ambas as emulsões apresentam a capacidade de atrair linfócitos para o local de injeção. Camundongos que receberam injeção de antígeno emulsificado com adjuvante de origem mineral apresentaram uma reação inflamatória mais intensa, inclusive com necrose

coagulativa no tecido muscular adjacente em comparação com os animais que receberam o antígeno emulsificado com óleo de arroz. Resultados semelhantes a estes foram descritos por França *et al.* (2006) que relataram o uso de vacinas contendo adjuvante à base de óleo mineral como uma das causas da alta ocorrência de lesões em tecidos musculares de bovinos abatidos em frigoríficos no estado de Goiás.

Em se tratando de um óleo biodegradável e usado na alimentação, os resultados da avaliação histológica mostram que a injeção subcutânea de uma emulsão feita com o óleo de arroz permaneceu no local por pelo menos 72 horas após a injeção nos coxins plantares de camundongos. De maneira geral, as emulsões têm capacidade adjuvante por possibilitar uma liberação sustentada do antígeno em um determinado período de tempo, fator necessário para estimular a resposta imune e gerar altos títulos de anticorpos (BILLIAU, MATTHYS, 2001). Além disso, as emulsões protegem o antígeno protéico de uma rápida degradação pelas enzimas proteolíticas (AUCOUTURIER, DUPUIS, GANNE, 2001).

Os resultados obtidos da DTH, em associação com as análises das alterações histológicas do local de injeção das emulsões, indicam que o óleo de arroz apresenta uma ação adjuvante na resposta Th1, porém com mínimos efeitos colaterais. Como o óleo de arroz estimulou a produção de IgG1, que é parcialmente dependente de IL-4, pode-se sugerir uma resposta mista entre Th1 e Th2 para o efeito adjuvante do óleo de arroz em camundongos da linhagem C57BL/6, a qual apresenta um padrão predominantemente Th1 (KHAJURIA *et al.*, 2007; AGGER *et al.*, 2008).

Embora a avaliação comportamental não tenha sido o objeto desse estudo, é importante ressaltar que camundongos imunizados com o adjuvante completo de Freund para a indução da DTH apresentaram um pronunciado edema acompanhado por um aumento na sensibilidade dolorosa dos coxins plantares que receberam a injeção de OVA emulsificada com IFA, em comparação aos camundongos que receberam OVA emulsificada com óleo de arroz. Foi também verificado que os camundongos injetados com OVA+IFA no coxim plantar apresentaram uma redução da ingestão de água e ração, fato esse decorrente do desconforto em permanecer com as patas traseiras apoiadas no piso das gaiolas, indicando a presença de dor aguda gerada pelo intenso edema das patas. Resultados semelhantes a estes foram

também descritos em camundongos que receberam injeções contendo óleo mineral (LEENARS, KOEDAM, WESTER, 1998).

A análise da produção de IFN- γ , IL-4 e IL-10 mostrou um equilíbrio entre a produção das citocinas do tipo Th1 (IFN- γ) e Th2 (IL-4) entre os grupos de camundongos imunizados com OVA solúvel ou emulsificada com óleo de arroz ou IFA. Contudo, os animais imunizados, por via intraperitoneal, com OVA+IFA apresentaram uma redução significativa dos níveis de IL-10. A principal justificativa para esse resultado se deve ao fato do óleo mineral apresentar toxicidade maior quando administrado por via intraperitoneal.

A partir dos resultados, conclui-se que o óleo de arroz forma um depósito no local da injeção, é englobado por macrófagos, estimula a produção de anticorpos e a DTH e provoca efeitos adversos menos intensos do que óleo mineral. A partir desse conjunto de dados pode-se sugerir a possibilidade do uso do óleo de arroz como adjuvante em vacinas a fim de promover uma minimização dos efeitos colaterais, como a formação de reações inflamatórias do tipo granulomatosas, levando a perda de extensas áreas musculares adjacentes, como vem ocorrendo na maioria das vacinações dos animais de produção (VALTULINI *et al.*, 2005; FRANÇA *et al.*, 2006).

7- Conclusões

A partir dos resultados obtidos, foram elaboradas as seguintes conclusões:

- Quanto à produção de anticorpos anti-OVA, o óleo de arroz apresentou ação adjuvante superior durante a resposta secundária em comparação aos camundongos imunizados com OVA solúvel, quer seja por via SC ou por via IP, porém, sua ação adjuvante foi inferior quando comparada aos animais imunizados com OVA emulsificada com IFA;
- O óleo de arroz foi capaz de estimular uma DTH, porém em valores inferiores aos estimulados por CFA. Contudo, na avaliação histológica, o óleo de arroz apresentou pouco efeito adverso no local da injeção;
- As avaliações histológicas mostraram que a emulsão do óleo de arroz manteve-se no local da injeção, demonstrando seu efeito depósito;
- Não houve diferença na produção de citocinas (IFN- γ , IL-4 e L-10) pelas células dos baços de camundongos imunizados por via SC com OVA solúvel ou emulsificada com óleo de arroz ou IFA, porém, camundongos imunizados com OVA emulsificada com IFA, por via IP, apresentaram níveis significativamente menores na produção de IL-10 em comparação aos imunizados com OVA emulsificada com óleo de arroz.

8- Referências bibliográficas

- AGGER, E. M. et al. Adjuvant modulation of the cytokine balance in *Mycobacterium tuberculosis* subunit vaccines, immunity, pathology and protection. **Immunology**, v. 124, p. 175-185, 2008.
- AGUILAR, J.C., RODRIGUEZ, E. G. V. Vaccine adjuvants revisited. **Vaccine**, v. 25, p. 3752-3762, 2007.
- ALISSON, A. C., BYARS, N. E. Immunological adjuvants: desirable properties and side effects. **Molecular immunology**, v. 28, p. 279-284, 1991.
- ALVING, C. R. Design and selection of vaccine adjuvants: animal models and human trials. **Vaccine**, v. 20, p. 56-64, 2002.
- AUCOUTURIER, J., DUPUIS, L., GANNE, G. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. **Vaccine**, v. 19, p. 2666-2672, 2001.
- AUDIBERT, F. M. Adjuvants for vaccines, a quest. **International immunopharmacology**, v. 3, p. 1187-1193, 2003.
- AUDIBERT, F. M., LISE, L. D. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. **Immunology today**, v. 14, p. 281-284, 1993.
- AUGER, M. J., ROSS, J. A. **The natural immune system**. 2.ed. Oxford: Oxford University Press, 1992. 258p.
- BAHNEMANN, H. G., MESQUITA, J. A. Oil-adjuvant vaccine against foot-and-mouth disease. **Boletín del centro panamericano de fiebre aftosa**, v. 53, p. 25-30, 1997.
- BAYLOR, W. N., EGAN, W., RICHMAN, P. Aluminium salts in vaccines-perspective. **Vaccine**, v. 20, p. 18-23, 2002.
- BILLIAU, A., MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune disease. **Journal of leukocyte biology**, v. 70, p. 849-860, 2001.

BOMFORD, R. The comparative selectivity of adjuvants for humoral and cell-mediated immunity. **Clinical experimental immunology**, v. 39, p. 435-441, 1980.

BREIMAN, R. F. Vaccines as tools for advancing more than public health perspectives of a former director of the national vaccine programme office. **Clinical infectious diseases**, v. 32, p. 283-288, 2006.

BREWER, J. M. et al. In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. **European journal of immunology**, v. 26, p. 2062-2066, 1996.

BREWER, J. M. How do aluminium adjuvants work? **Immunology letters**, v. 102, p. 10-15, 2006.

COOPER, P. D. **Strategies in vaccine design**. Austin: Landes company, 1994. 352p.

COX, J. C., COULTER, A. R. Adjuvants: a classification and review of their modes of action. **Vaccine**, v. 15, p. 248-256, 1997.

CPMP - Committee for Proprietary Medicinal products. **Note for guidance on the pre-clinical, pharmaceutical and toxicological testing of vaccines**. Disponível em < <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/046595en.pdf> > acesso em 05/09/08.

DELVES, P. J., ROITT, I. M. The immune system. **Advances in immunology**, v. 343, p. 37-39, 2000.

DURVERGER, A. et al. *Bacillus anthracis* edema toxin acts as an adjuvant for mucosal immune responses to nasally administered vaccine antigens. **The journal of immunology**, v. 176, p. 1776-1783, 2006.

EGHAFONA, N. O. Immune responses following cocktails of inactivated measles vaccine and *Arachis hypogaea* L. or *Cocos nucifera* L. oils adjuvant. **Vaccine**, v.14, p. 1703-1706, 1996.

EHRETH, J. The global value of vaccination. **Vaccine**, v. 1, p.3569-3570, 2002.

ESSER, M. T., et al. Memory T cells vaccines. **Vaccine**, v. 21, p. 419-431, 2003.

FEARON, D. T., LOCKSLEY, R. M. The instructive role of innate immunity in acquired immune response. **Science**, v. 272, p. 50-54, 1996.

FRANÇA, A. T. et al. Perdas econômicas por abscessos vacinais e/ou medicamentosos em carcaças de bovinos abatidos no estado de Goiás. **Ciência animal brasileira**, v. 7, p. 93-96, 2006.

GOLDSBY, A. et al. **Immunology**. 4.ed. New York: W. H. Freeman, 2001. 423p.

GRAF, E., EATON, J. W. Suppression of colonic cancer by dietary phytic acid. **Nutrition and cancer**, v. 19, p. 11-19, 1993.

GOTO, N. et al. Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. **Vaccine**, v. 11, p. 914-918, 1993.

GUPTA, R. K., et al. Adjuvants: a balance between toxicity and adjuvanticity. **Vaccine**, v. 11, p. 293–306, 1993.

GUPTA, R. K., SIBER, G. R. Adjuvant for human vaccines: current status, problems and future prospects. **Vaccine**, v.13, n.14, p. 1263-1276, 1995.

GUPTA, R. K. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. **Advanced in drug delivery reviews**, v. 32, p. 155-172, 1998.

HERNANDEZ, A. et al. Evolution of bovine cutaneous delayed type hypersensitivity to various test antigens and mitogen using several adjuvants. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 104, p. 45-58, 2005.

HILTON, J. et al. Characteristics of antibody responses induced in mice by protein allergens. **Foods and chemical toxicology**, v. 35, p. 1209-1218, 1997.

JANEWAY, C. A., TRAVERS, M. W., SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia: sistema immune na saúde e na doença**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 767p.

KHAJURIA, A. et al. A new vaccine adjuvant a potent enhancer mixed Th1/Th2

immune responses in mice immunized with HBsAg. **Vaccine**, v. 25, p. 4586-4594, 2007.

LEENARS, P. P., KOEDAM, M. A., WESTER, P. W. Assessment of side effects induced by injection of different adjuvant/antigen combinations in rabbits and mice. **Laboratory animals**, v. 32, p. 387-406, 1998.

LENZO, J. C. et al. Cytokine expression in murine cytomegalovirus-induced myocarditis: modulation with interferon therapy. **Cellular immunology**, v. 223, p. 77-86, 2003.

MALAGA, C. A. et al. Tuberculosis-like lesions arising from the use of Freund's complete adjuvant in an owl monkey *Aotus* sp. **Journal of medical primatology**, v. 33, p. 109-112, 2004.

MANZ, R. A. et al. Maintenance of serum antibody levels. **Annual reviews in immunology**, v. 23, p. 367-386, 2005.

MARCIANI, D. J. Vaccine adjuvants: role and mechanism of action in vaccine immunogenicity. **Drug discovery today**, v. 8, p. 934-943, 2003.

MBAWUIKE, I., ZANG, Y., COUCH, R. B. Humoral and cell-mediated immune responses of humans to inactivated influenza vaccine with or without QS21 adjuvant. **Vaccine**, v. 25, p. 3263-3269, 2007.

MCNEELA, E. A., MILLS, K. H. G. Manipulating the immune system: humoral versus cell-mediated immunity. **Advanced drug delivery reviews**, v. 51, p. 43-54, 2001.

MONCADA, C. et al. Simple method for the preparation of antigen emulsions for immunization. **Journal of immunological methods**, v. 162, p. 133-140, 1993.

MOSSONG, J., MULLER, C. P. Estimation of the basic reproduction number of measles during an outbreak in a partially vaccinated population. **Epidemiology and infection**, v. 124, p. 273-278, 2000.

MORO, E., JUNQUEIRA, J. O. B. Levantamento da incidência de reações vacinais e/ou medicamentosas em carcaças de bovinos ao abate em frigoríficos no Brasil. **A**

hora veterinária, v. 112, p. 74-77, 1999.

MORRONI, M. et al. Subcutaneous nodules in a patient hyposensitized with aluminum-containing allergen extracts. **Analytical cellular pathology**, v. 9, p. 235-241, 1995.

MOTA, E. F. **Atividade adjuvante dos óleos de amendoim (*Arachis hypogaea* L), algodão (*Gossypium hirsutum* L) e arroz (*Oryza sativa* L) na resposta imune humoral e celular**. Fortaleza: UFC, 2006. Tese (Doutorado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 2006.

O'HAGAN, D. T.; MACKICHAN, M. L., SINGH, M. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. **Biomolecular engineering**, v. 18, p. 69-85, 2001.

PARKIN, J., COHEN, B. An overview of the immune system. **Lancet**, v. 357, p. 1777-1789, 2001.

PATIL, P. K. et al. Immune response of goats against foot and mouth disease quadrivalent vaccine: comparison of double oil emulsion and aluminium hydroxide gel vaccines in eliciting immunity. **Vaccine**, v. 20, p. 2781-2789, 2002.

REYNOLDS, J. A. et al. Adjuvant activity of a novel metabolizable lipid emulsion with inactivated viral vaccines. **Infection and immunity**, v. 28, n. 32, p. 937-943, 1980.

RÖNNBEG, B., FEKADU, M., MOREIN, B. Adjuvant activity of non toxic *Quillaja saponaria* components for use in iscom-matrix. **Vaccine**, v. 13, p. 1375-1382, 1995.

SCHIJNS, V. E. J. C. Immunological concepts of vaccine adjuvants activity. **Current opinion in immunology**, v. 12, p. 456-463, 2000.

SCHIJNS, V. E. J. C. Antigen delivery systems and immunostimulation. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 87, p. 195-198, 2002.

SCHIJNS, V. E. J. C. Mechanism of vaccine adjuvant activity: initiation and regulation of immune response by vaccine adjuvants. **Vaccine**, v. 21, p. 829-831, 2003.

SESARDIC, D. DOBBELAER, R. European union regulatory developments for new vaccine adjuvants and delivery systems. **Vaccine**, v. 22, p. 2452-2456, 2004.

SILVA, A. C. M. et al. Adjuvant effect of corn and olive oils in mouse immune response. In: VI Pharmatech, III Annual meeting of SBTF, 2001, Recife. **Anais**. Recife: UFPE, 2001. p. 165-166.

SINGH, M., O'HAGAN, D. T. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. **International journal of parasitology**, v. 33, p. 469-478, 2003.

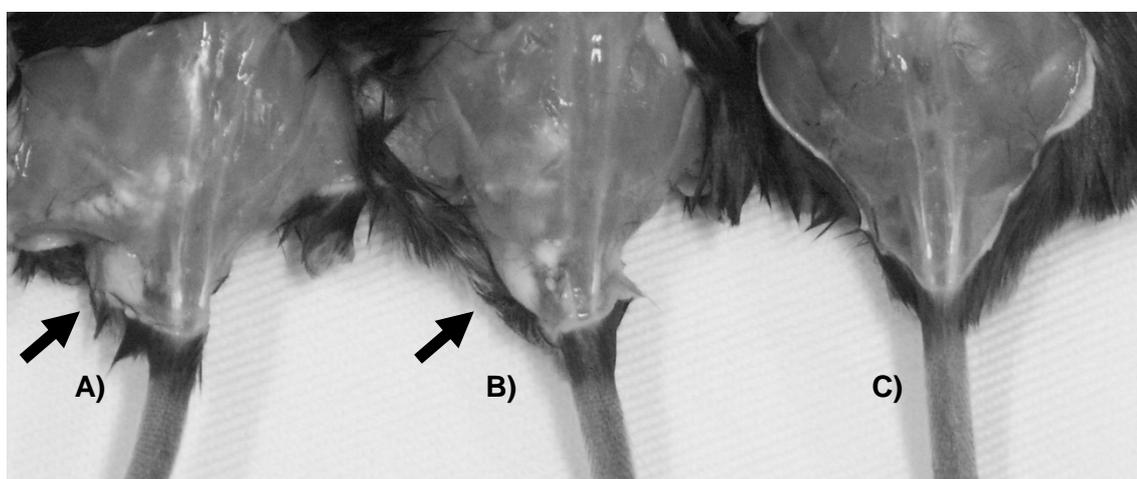
VALTULINI, S. et al. Aluminium hydroxide induced granulomas in pigs. **Vaccine**, v. 23, p. 3999-4004, 2005.

VENKATESAN, P., WALEKIN, D. ELISA for parasitologists: or lies, damned lies and ELISAs. **Parasitology today**, v. 9, p. 228-232, 1993.

9- Apêndices



Apêndice A - Granuloma na região cervical de camundongo C57BL/6, local de imunização feita por via SC, 21º dia após a imunização com OVA emulsificada em IFA, o granuloma permaneceu ao longo dos 42 dias.



Apêndice B – Foto feita no 5º dia após a imunização por via subcutânea na base da cauda dos camundongos. A) e B) Nota-se, macroscopicamente, a presença da emulsão em camundongos imunizados com OVA emulsificada em CFA (setas); C) camundongos imunizados com OVA emulsificada com óleo de arroz.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)