

*A Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia e Parasitologia*



*“Estudo da Cinética do Infiltrado Celular Inflamatório
Induzido por Adjuvantes de Vacinas em Bolhas de Ar
Formadas no Subcutâneo de Camundongos”*

Fabíola Cunha Bernardes e Rezende

*Florianópolis
2003*

Fabíola Cunha Bernardes e Rezende

**Estudo da Cinética do Infiltrado Celular Inflamatório
Induzido por Adjuvantes de Vacinas em Bolhas de Ar
Formadas no Subcutâneo de Camundongos**

**Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre
em Biotecnologia, Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, Centro de
Ciências Biológicas, Universidade
Federal de Santa Catarina.**

**Orientador: Prof. Dr. José Hermênio
Cavalcante Lima Filho**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos
Roberto Zanetti**

**Florianópolis
2003**

Morre um sonho
Nasce outro...
E assim vamos vivendo
De esperança...
Nossas mãos
Sempre tentando agarrar
O que sonhamos.
E no impulso deste gesto
Vai inteiro o coração.
E se ele vai
Nos leva junto.
E é assim
Que nossos sonhos
Se transformam em realidade...

Cintia Moreira Kallás

A meus pais José Ricardo e Vânia,
pelo amor, carinho e apoio.
A meu marido, amigo e companheiro Mikael Jr.,
por estar em todos os momentos.
A meu irmão Ricardo,
pelos pequenos gestos que significaram muito.
À minha sobrinha Eduarda,
pelos momentos de doçura e alegria.

Agradecimentos

A

Meu orientador e amigo Prof. Dr. José Hermênio Cavalcante Lima Filho, pela confiança mais uma vez.

Meu co-orientador Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti, pela paciência e compreensão.

Minha grande amiga Bianca Fiúza Lima, pelas palavras amigas de sempre.

Colega e amiga Priscilla Emmanuelle Machado, pela força e companheirismo durante todo o curso.

Amigos do MIP, por todos os momentos.

Dra. Silvia, Analia, Renata e Marilene, pela paciência e grande colaboração.

Toda minha família, pelo amor e apoio de sempre.

Vallée S.A. (São Paulo), pelo suporte técnico.

E a todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Resumo

A inflamação é uma resposta do organismo a um estímulo agressor, químico, físico ou biológico, que tem como finalidade restaurar a integridade tecidual. Este fenômeno biológico é realizado através do acúmulo e ativação de leucócitos no local da injúria, que contribuem para a eliminação de antígenos e recuperação da homeostase. A inflamação é, também, fundamental para o estabelecimento da imunidade específica e eficiência da imunização. Uma das medidas de imunização mais eficaz é a vacinação. Uma vacina deve ter alto poder imunogênico para ser eficaz na profilaxia de doenças infecto-contagiosas. Desta forma, elas são geralmente associadas a substâncias adjuvantes, que amplificam a resposta protetora da vacina. Entretanto, alguns destes adjuvantes induzem efeitos indesejáveis, tais como excesso de inflamação local e sinais flogísticos sistêmicos. O presente estudo pretendeu verificar a atividade inflamatória induzida por seis adjuvantes, associados a uma vacina contra vírus rábico para futuro uso em animais. Os adjuvantes testados neste trabalho foram o Algamulin, Avridine, Hidróxido de Alumínio, β -Glucana (2 e 4 mg), SEPPIC-I e SEPPIC-II. Para este objetivo as diferentes formulações adjuvantes (50 μ l) adicionadas à vacina (50 μ l), a vacina pura (50 μ l) e PBS (Controle) foram inoculados em uma bolha de ar (3ml) formada do dorso (subcutâneo) de camundongos albinos da linhagem *Swiss*. Após 24 e 72 horas do desafio, os animais foram sacrificados e o conteúdo celular obtido da cavidade foi associado à intensidade do processo inflamatório. A contagem total de células leucocitárias e suas subpopulações foi realizada por Citometria de Fluxo. Para a análise de subpopulações, os leucócitos foram preparados e marcados, conforme o protocolo da PharMingen®, com anticorpos conjugados com fluoresceína ou ficoeritrina-R, específicos para as populações de Linfócitos B (anti-CD 19), Linfócitos T (anti-CD 3) e sub-população de Linfócitos T (anti-CD 4 e anti-CD 8). Nossos resultados permitem concluir que: 1. Todos os adjuvantes induzem inflamação cutânea; 2. Existe diferença de intensidade e na qualidade do infiltrado inflamatório induzido entre os diferentes adjuvantes utilizados. Alguns adjuvantes induzem um infiltrado inflamatório predominantemente de células mononucleares, Outros de polimorfonucleares; 3. Estas diferenças parecem resultar em padrões de resposta imune diferentes, de acordo com a célula mais estimulada. Os padrões de resposta predominantemente mononuclear foram observados com SEPPIC-I e SEPPIC-II. O Padrão de resposta apresentando grande quantidade de células polimorfonucleares foi observado com Hidróxido de Alumínio, Algamulin e Beta Glucana; 4. Avridine apresentou um infiltrado misto no qual havia a presença tanto de células mononucleares quanto polimorfonucleares;

Tais resultados podem prover dados para a seleção de adjuvantes para uso animal ou, eventualmente, para seres humanos. Trata-se, portanto, de um desenvolvimento biotecnológico importante de aplicação em ciência básica e aplicada.

Palavras-chave: inflamação; bolha de ar subcutânea; adjuvantes.

Abstract

Inflammation is the organism response against an aggressor of chemical, physical or biological origin. The main purpose of this response is to recuperate the tecidual integrity. This phenomenon is accomplished through leucocytes accumulation and activation at the injury site, which contribute to antigen elimination and homeostasis recovery. Inflammation is also important for the establishment of a specific immunity and immunization efficiency. Vaccine, one the most effective methods of immunization, should be immunogenic for an effective prophylaxis of contagious diseases. Moreover, vaccines are usually associated to adjuvant to amplify the protective vaccine immune response. However, some of these adjuvants can induce side effects. Among these are excess of local inflammation and inflammatory signs. The present study intended to observe the inflammatory activity induced by six adjuvants, associated to a rabies virus vaccine to be applied in animals in near future. The adjuvants tested were Algammulin, Avridine, Aluminum Hydroxide, β -Glucan (2 and 4 mg), SEPPIC-I and SEPPIC-II. The different adjuvants (50 μ l) added to the vaccine (50 μ l), the pure vaccine (50 μ l) and PBS (Control) were inoculated in air pouch (3ml) in the subcutaneous of Swiss mice. After 24 and 72 hours of the challenge, the animals were sacrificed and the cellular content of the cavity was determined to evaluate the inflammatory response intensity. The total count of leucocytes was accomplished by flow cytometry. For the subpopulations analysis, the leucocytes were prepared and stained, as determined by the PharMingen® protocol for B lymphocytes (anti-CD 19), T lymphocytes (anti-CD 3) and T lymphocyte subpopulation (anti-CD 4 and anti-CD 8). Our results demonstrated that: 1. All adjuvants can induce cutaneous inflammation; 2. However, the quality and intensity of each inflammatory infiltrate is different depend upon the adjuvant used. Some adjuvants induce a mononuclear cells inflammatory infiltrated, and others of polymorphonuclears cells; 3. These differences seem to result from different patterns of immune response. The main mononuclear response was observed with SEPPIC-I and SEPPIC-II. The Aluminum Hydroxide, Algammulin and β -glucan induced a response presenting great amount of polimorfonuclears cells; 4. Avridine presented a mixed infiltrated with of mononuclears and polimorfonuclears cells. Such results may provide data for better adjuvant selection for use in animals and humans. Moreover, it is an important biotechnological development with applications in basic or applied science.

Keywords: inflammation; subcutaneous air pouch; adjuvants.

Índice

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Resposta Inflamatória.....	11
1.1.1 Aspectos gerais da inflamação.....	11
1.1.2. Componentes da Inflamação Aguda.....	13
1.1.2.1 Vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular.....	13
1.1.2.2 Migração celular.....	14
1.1.3 Células inflamatórias.....	14
1.1.4 Inflamação crônica.....	15
1.2 Adjuvantes.....	16
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo Geral.....	20
3.2 Objetivos Específicos.....	20
4. METODOLOGIA.....	20
4.1. Animais.....	21
4.2. Adjuvante.....	21
4.3. Preparação das Bolhas Subcutâneas.....	22
4.4. Isolamento do Infiltrado Inflamatório.....	22
4.5. Análise Quantitativa e Quantitativa do Infiltrado por Citometria de Fluxo.....	22
5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	24
6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
7 RESULTADOS.....	26
7.1 Análise Qualitativa e Quantitativa do Infiltrado por Tamanho e Granulosidade	26
7.2 Análise Qualitativa do Infiltrado por Citometria de Fluxo Confirmadas por	
Marcadores Celulares de Superfície.....	30
8 DISCUSSÃO.....	44
9 CONCLUSÕES.....	53
10 BIBLIOGRAFIA.....	54

Lista de Ilustrações

Tabela 1: Proporção das Subpopulações Leucocitárias obtida através da Aquisição por Citometria de Fluxo em 15 segundos.....	29
Tabela 2: Porcentagem de linfócitos.....	43
Figura 1: Análise do infiltrado celular inflamatório por contagem de células totais em Citometria de Fluxo.....	27
Figura 2: Resultado da citometria de fluxo de uma amostra de exsudato da cavidade da bolha de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem <i>Swiss</i>	28
Figura 3: Cinética de migração granulocítica	30
Figura 4: Cinética de migração macrofágica.....	31
Figura 5: Cinética de migração linfocitária.....	33
Figura 6: Cinética de migração de linfócitos T CD4+.....	34
Figura 7: Curso da infiltração de linfócitos T CD4 na bolsa de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> submetidos ou não ao desafio com adjuvante...35	
Figura 8: Curso da infiltração de linfócitos T CD4 na bolsa de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> submetidos ou não ao desafio com adjuvante...36	
Figura 9: Cinética de migração de linfócitos T CD8+	37
Figura 10: Curso da infiltração de linfócitos T CD8 na bolsa de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> submetidos ou não ao desafio com adjuvante...38	
Figura 11: Curso da infiltração de linfócitos T CD8 na bolsa de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> submetidos ou não ao desafio com adjuvante...39	
Figura 12: Cinética de migração de linfócitos B CD19+.....	40
Figura 13: Curso da infiltração de linfócitos B CD19 na bolsa de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> submetidos ou não ao desafio com adjuvante...41	
Figura 14: Curso da infiltração de linfócitos B CD19 na bolsa de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> submetidos ou não ao desafio com adjuvante...42	

Lista de Siglas

APC (Antigen Presenter Cell) - Célula apresentadora de antígeno

CD (Cluster of Differentiation) - Conjunto de diferenciação

Células NK - Células *Natural Killer*

EDTA (Ethylenediaminetetraacetate Dissodium Salt) – Etilenodiaminotetracético Sal Dissódico

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

FSC (Forward Scatter Counter) - Detector de dispersão frontal

IFN- γ - Interferon gama

IL - Interleucina

ISCOMS - Complexos Imuno estimulantes

MHC-I (Major Histocompatibility Complex) - Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe I

MHC-II (Major Histocompatibility Complex) - Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II

MIP - Departamento Microbiologia e Parasitologia

NO (Nitric Oxide) - Óxido Nítrico

PE - Ficoeritrina

SSC (Side Scatter Counter) - Detector de dispersão lateral

TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) - Fator de necrose tumoral-alfa

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

PBS (Phosphate Buffered Saline) - Salina tamponada por fosfato

1. Introdução

1.1 Resposta Inflamatória

1.1.1 Aspectos gerais da inflamação

Quando um tecido perde sua integridade por uma agressão, seja ela de natureza infecciosa ou não, inicia-se um processo com o objetivo de restaurá-la. Esta resposta do organismo é complexa e é conhecida como inflamação. A inflamação é o processo de manutenção da homeostase do organismo que resulta em acúmulo e ativação de leucócitos no local da injúria objetivando a eliminação dos agentes agressores e de tecidos lesados. Isto é importante para a restauração da integridade dos tecidos, pois a cicatrização é componente da inflamação. A resposta inflamatória é também, necessária para iniciar o estabelecimento da imunidade específica (JANCAR, 2001).

A inflamação é uma reação que ocorre no tecido conjuntivo vascularizado, envolvendo o plasma, as células circulantes, os vasos sanguíneos e os componentes extravasculares do tecido conjuntivo. Todas as células circulantes estão envolvidas neste processo. Entre as células do tecido conjuntivo, envolvidas na inflamação estão os mastócitos, que circundam intimamente os vasos sanguíneos, os fibroblastos do tecido conjuntivo e macrófagos e linfócitos residentes ocasionais (ROBBINS, COTRAN & KUMAR, 1991).

Uma vez que componentes do sistema imune - anticorpos e leucócitos - são normalmente transportados na corrente sanguínea, não causa surpresa o fato de os fenômenos vasculares desempenharem um papel destacado na inflamação (ROBBINS *et al*, 1991).

A resposta inflamatória foi dividida tradicionalmente em respostas agudas e crônicas. A resposta aguda inicia-se rapidamente, tem curta duração e é relativamente uniforme. Caracteriza-se por acúmulo de fluido, proteínas plasmáticas e leucócitos, principalmente neutrófilos. Em sua forma clássica, a inflamação aguda é caracterizada através de cinco sinais cardinais: calor, rubor (vermelhidão), tumor (edema), dor e perda de função. Todos estes sinais são diretamente relacionados às mudanças vasculares locais. Em contraste, a resposta crônica é de duração mais longa e inclui afluência de linfócitos e

monócitos, que nos tecidos se diferenciam em macrófagos, e crescimento de fibroblastos para regeneração tecidual (PAUL, 1993).

O modo pelo qual é iniciado o processo inflamatório é importante, pois dele depende em parte o conhecimento da natureza e das particularidades da reação inflamatória, para descobrir mecanismos de interferência no processo. Os antígenos podem iniciar inflamação por vários mecanismos distintos. As células lesadas, por exemplo, podem lançar produtos de degradação que iniciam uma ou mais cascatas de proteases plasmáticas (proteínas do complemento, cininas e fatores de coagulação) e estes eventos podem iniciar e/ou aumentar a expressão de citocinas que disparam o processo inflamatório (RYLANDER, 1987; LAWLEY & KUBOTA, 1991; KAPP, 1993; DINARELLO, 1994; MARSHALL & BIENENSTOCK, 1994; BINGAMAM *et al*, 2000). O processo inflamatório é iniciado, regulado e eliminado pelas ações dos mediadores da inflamação (RAEKALLIO & NIEMINEM, 1979).

As proteínas do Complemento se tornam ativas através de uma série de eventos proteolíticos, e promovem aumento da resposta inflamatória através da ligação a organismos estranhos, aumentando a fagocitose (componentes C3b e C5b), funcionando como agentes indutores de aumento da permeabilidade vascular diretamente ou indiretamente através da degranulação de mastócitos e quimioatraentes para células inflamatórias (C3a e C5a) (MULLER-EBERHARD, 1992; GOLDSTEIN, 1992; HOLERS, 1996; KOZEL, 1996; WARD, 1996).

Independentemente do agente causal, a quebra da homeostase inicia uma série de eventos moleculares que produzem mediadores pró-inflamatórios resultando nas principais mudanças fisiológicas que caracterizam a inflamação aguda: vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, aumento de fluxo sanguíneo, migração de leucócitos do sangue periférico aos tecidos, acúmulo no sítio inflamatório e ativação dos leucócitos para destruição e, se possível, eliminação das células mortas da lesão tecidual (ROBBINS & COTRAN, 1979; RAMPART & VAN DAMME, 1989; WHITE, 1990). Quando o tecido lesado é eliminado, mediadores antiinflamatórios permitem a parada do processo (ANDERSON, 1996), o que evita dano desnecessário para os tecidos. Se a inflamação resulta em destruição incompleta do agente, o processo inflamatório persiste evoluindo para uma inflamação crônica (SCHMIDT *et al*, 1979; YOSHINO *et al*, 1985). Entretanto, vale

destacar que os mediadores anti-inflamatórios são produzidos desde o início do processo. Assim, a inflamação resulta da preponderância de fatores pró-inflamatórios e o seu desaparecimento deve-se ao predomínio de fatores anti-inflamatórios.

1.1.2 Componentes da inflamação aguda

1.1.2.1 Vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular

Imediatamente após a injúria há uma breve constrição das arteríolas locais, seguida de uma dilatação dos vasos sanguíneos na área afetada. Como resultado, o fluxo sanguíneo no local lesado reduz e a quantidade de sangue aumenta, o que caracteriza a vermelhidão (rubor) e calor que se instalam no foco inflamatório (LISTON, 1984; KUPPER *et al*, 1987; THEPEN *et al*, 2000). Como os vasos sanguíneos estão dilatados, sua permeabilidade aumenta permitindo que as proteínas plasmáticas e os leucócitos, predominantemente neutrófilos, emigrem da circulação e se acumulem no foco de agressão, caracterizando o edema local (ROBBINS *et al*, 1991).

Em condições normais, as células endoteliais vasculares funcionam como uma membrana semipermeável e restringem as proteínas plasmáticas para o espaço intravascular. Em resposta a estímulos inflamatórios, células endoteliais das vênulas se contraem, e as junções intercelulares se alargam para produzir espaços que permitem a passagem de maior quantidade de proteínas plasmáticas para os tecidos. Danos mais severos podem ser associados com necrose das células endoteliais e vazamento descontrolado de proteínas e células do sangue (HENRIQUES *et al*, 1987; BUCKLEY *et al*, 1991; OMATA *et al*, 1991).

1.1.2.2 Migração celular

Um outro componente importante na inflamação é o recrutamento de leucócitos, principalmente neutrófilos, na fase aguda da circulação sanguínea para o foco de atividade inflamatória. O primeiro evento observado é a expressão de receptores específicos tanto nas paredes endoteliais como na membrana plasmática dos leucócitos. A partir da vasodilatação ocorre o fenômeno da marginação, onde os neutrófilos parecem rolar ao longo da periferia dos vasos, aos quais aderem em seguida com a ajuda das moléculas de adesão. A partir deste ponto, os neutrófilos migram para o local de inflamação, num fenômeno conhecido

como diapedese, através de um gradiente de fatores quimiotáticos, entre eles algumas citocinas, como a IL-8, onde se acumulam no foco inflamatório (SCHUBERT *et al*, 1989).

1.1.3 Células Inflamatórias

Os neutrófilos estão entre as células mais prevalentes na resposta aguda, respondem aos mediadores inflamatórios através da migração e eventualmente fagocitose e destruição dos indutores da inflamação, acabando por resultar em resolução da inflamação, reparo tecidual e recuperação da homeostase (MOVAT *et al*, 1987; FOLLIN, 1999; TERUI *et al*, 2000). São provavelmente os mais importantes fagócitos profissionais, primeiras células a chegar ao local da agressão, grandes produtores de metabólitos oxidativos e estão prontos para matar o organismo ou agente causador da inflamação. Durante o processo de destruição do antígeno, os metabólitos oxidativos liberados pelos neutrófilos podem causar sérios danos teciduais, e estas células são programadas para viver pouco entrando em processo de apoptose. Elas perfazem cerca de 70% dos leucócitos presentes na circulação sanguínea (BERNARDES, 2000).

Os eosinófilos são também recrutados para os sítios inflamatórios principalmente em respostas de origem alérgica do trato respiratório, do trato gastrointestinal e da pele. Além do mais, estas células podem estar presentes em resposta à infecções helmínticas (DIEU-NOSJEAN *et al*, 2000; TERUI *et al*, 2000).

Os macrófagos são células residentes nos tecidos ou formas evolutivas dos monócitos circulantes que saíram do sangue e fixaram residência nos tecidos. Estas células podem iniciar o processo de destruição dos fatores etiológicos da inflamação ou complementar a função dos neutrófilos na resposta aguda. No sítio inflamatório, os macrófagos residentes reagindo ativamente contra os agentes inflamatórios liberam citocinas que atraem os neutrófilos para fora do sangue e em direção ao foco inflamatório em grande quantidade, onde logo se tornam as células fagocíticas dominantes (PARHAM, 2001). Entretanto, sua ação principal fica evidente nas inflamações crônicas atuando como células apresentadoras de antígeno aos linfócitos T, nas imunidades específicas. Uma vez ativados, os macrófagos liberam uma variedade de citocinas, que possuem funções importantes na imunidade inata e ao mesmo tempo na preparação do cenário para que a

resposta imune adaptativa se desenvolva (EGAN *et al*, 1996; DIEU-NOSJEAN *et al*, 2000; TERUI *et al*, 2000).

Os linfócitos T desempenham seu papel na inflamação aumentando a resposta dos macrófagos pela produção de citocinas pró-inflamatórias. Os linfócitos B atuam na produção de anticorpos e estabelecimento de imunidade específica. Entretanto, em uma fase inicial, podem apresentar antígenos aos linfócitos T. (EGAN *et al*, 1996; DIEU-NOSJEAN *et al*, 2000; TERUI *et al*, 2000; PARHAM, 2001).

1.1.4 Inflamação crônica

A inflamação crônica é considerada como uma inflamação de duração prolongada, semanas ou meses, na qual se processam, simultaneamente, inflamação ativa, destruição tecidual e tentativa de cura (ROBBINS *et al*, 1991). É resultado da persistência do fator etiológico, seja um agente infeccioso ou então de restos de microorganismos, corpo estranho, produtos do metabolismo ou ainda reações de hipersensibilidade e autoimunidade. Nestas situações ocorre migração de linfócitos T auxiliar (*helper* - CD4) que liberam citocinas ativadoras de macrófagos e linfócitos B. Os macrófagos, assim ativados, tornam-se muito mais potentes para eliminar microorganismos e apresentar epitopos antigênicos aos linfócitos (JANCAR, 2001).

Dentre as mais importantes sequelas deixadas pela inflamação crônica está a formação de tecidos granulomatosos (BOROS, 1994; WUNN & CHEEVER, 1995). Granuloma é um conjunto de células inflamatórias, principalmente macrófagos e linfócitos, que estão eventualmente cercados por uma camada fibrosa, formando um tecido como consequência de uma resposta inflamatória persistente. Embora os mecanismos de formação de granulomas e a resolução da inflamação não estejam muito bem esclarecidos, linfócitos especificamente sensibilizados e seus mediadores solúveis (como TNF- α e IFN- γ) participam da formação e manutenção do granuloma em seu estado ativo. Algumas condições predispõem um indivíduo à formação de granulomas, como a presença de bactérias intracelulares e antígenos inorgânicos. (CHENSUE *et al.*, 1995; KUNKEL *et al.*, 1996).

1.2 Adjuvantes

Como explicitado anteriormente, a inflamação é importante para o estabelecimento da imunidade específica, sendo, então, de fundamental importância nos processos de imunização artificial, ou seja, vacinação.

Enquanto a pesquisa por vacinas ainda estava em desenvolvimento, investigadores já notavam que adicionando certos compostos a um inóculo poderia aumentar a resposta imune obtida. Inicialmente, os adjuvantes eram compostos principalmente por matérias brutas. Por exemplo, notou-se que adicionando pus à toxina da difteria obtinha-se um aumento de resposta antitoxina em cavalos (KAEBERLE, 1986). Resultados similares foram demonstrados por RAMON com hidróxido de alumínio, ágar, lecitina, óleo de amido, saponinas, tapioca e inclusive migalhas de pão, em resposta ao tétano e à vacina contra difteria (*apud* GUPTA *et al*, 1993) Como poderia ser esperado, a adição de estimulantes impuros causou efeitos adversos indesejáveis (PASSOLD, 2001).

Qualquer material que aumente ou ocasione resposta imune a um antígeno é considerado um adjuvante. Adjuvantes são substâncias imunopotencializadoras, podendo ser compostos naturais ou sintéticos. O uso de adjuvantes em vacinas é particularmente importante quando o antígeno possui baixa imunogenicidade. Isto se aplica a antígenos constituídos por subunidades de peptídeos e peptídeos recombinantes, cuja estrutura e conformação são menos complexas que vírus e bactérias intactos/inativados. A utilidade de um adjuvante é dependente de sua segurança e capacidade em estimular imunidade por longos períodos (CHIN & GIL, 1998).

Historicamente, os melhores componentes utilizados como adjuvantes de vacinas incluem extratos de parede bacteriana (micobactéria), óleos de parafinas, sais de metais (alumínio), endotoxinas e óleo mineral. Lipossomos, interferon, complexos imunoestimulantes (ISCOMS) e citocinas têm sido utilizados ou investigados como potenciais adjuvantes (WALLACE, 1996).

A utilização de substâncias adjuvantes auxilia a formação de uma resposta imune em maior intensidade, maior duração e mais rápida com uma quantidade menor de antígeno, podendo assim diminuir custos na produção de vacinas. A produção de vacinas sintéticas e de subunidades é muito dispendiosa; com a utilização de adjuvantes potentes,

menor quantidade de antígeno será requerido para a estimulação de resposta imune efetiva. Este aspecto é importante para a produção de vacinas de combinações, onde com o uso de substância adjuvantes, a quantidade dos antígenos poderá ser diminuída, reduzindo também, problemas como, por exemplo, competição entre os antígenos (GUPTA & SIBER, 1995).

Vários mecanismos são propostos para explicar a eficiência dos adjuvantes e como eles podem melhorar a resposta da vacina ao antígeno: Os adjuvantes podem induzir inflamação local aumentando o contato do antígeno com células adicionais que são atraídas para o local; formar um depósito de antígeno liberando-o mais lentamente e prolongando assim sua interação com o macrófago (WALLACE, 1996); aumentar a velocidade e duração da resposta imune; modular a avidéz, especificidade, isotipo e distribuição de subclasses de anticorpos; estimular imunidade mediada por células; induzir imunidade de mucosas e aumentar a resposta imune em indivíduos imunologicamente imaturos ou senis (SINGH & O'HAGAN, 1999). Entretanto, parte desta resposta inflamatória induzida pelos adjuvantes pode ser destrutiva para os tecidos.

Alguns problemas são encontrados no desenvolvimento e uso de adjuvantes em vacinas humanas e veterinárias. A grande questão na utilização de adjuvantes em vacinas está na toxicidade e nos efeitos adversos de muitas formulações (GUPTA & SIBER, 1995).

EDELMAN (1980) lista um número de critérios que garantem a segurança de vacinas adjuvantadas. Além de segurança com respeito a reações locais, reações sistêmicas (toxicidade geral, pirogenicidade), doenças autoimunes, reações de hipersensibilidade, carcinogenicidade, teratogênese etc, um adjuvante ideal deve ser definido quimicamente de forma que possa ser fabricado constantemente. A preparação deve induzir uma resposta imune protetora a antígenos fracos, com baixas doses de antígenos e com poucas aplicações, deve ser efetivo em induzir uma resposta mais persistente e de alta qualidade, deve ser estável em consideração a adjuvantividade e toxicidade não apresentando nenhuma interação com o antígeno.

O único adjuvante aprovado para uso em vacinas humanas é o hidróxido de alumínio, pois os padrões de segurança das vacinas são elevados e não permitem os efeitos colaterais dos adjuvantes mais potentes. Os ISCOMs são transportadores lipídicos que agem como adjuvantes (possuem toxicidade mínima) carregando os peptídeos e proteínas ao citoplasma e permitindo respostas de células T (MHC classe I) aos peptídeos. Esses

transportadores estão sendo considerados para uso na imunização humana (HAWKINS *et al*, 1993).

Em muitas vacinas veterinárias são utilizados adjuvantes (AFONSO *et al*, 1994) como hidróxido de alumínio, saponina, avridine, entre outros, que conseguem amplificar a resposta inflamatória inicial induzida pela vacinação e aumentar a resposta imune ao antígeno específico (PRETO *et al*, 1991).

O mecanismo de ação e a resposta inflamatória induzidos pelos adjuvantes são, atualmente, pouco entendidos. Isto pode, inclusive, impedir o desenvolvimento de novos compostos. Nos processos de imunização deve haver, obrigatoriamente, uma resposta inflamatória, para que haja ativação dos mecanismos de imunidade específica (Linfócitos B e T). A imunização deve ser direcionada para este fim. Portanto a adição de adjuvantes ativa vários mecanismos efetores da resposta imune, porém apenas alguns são relevantes para o estabelecimento de uma resposta antígeno-específica eficiente. O adjuvante mais apropriado para cada vacina depende amplamente do tipo de resposta imune necessária para o estabelecimento de imunidade protetora (SINGH & O'HAGAN, 1999).

Desta forma, o estudo das características inflamatórias dos adjuvantes é importante na interpretação de sua capacidade de indução imunogênica e no entendimento dos efeitos colaterais associados ao seu uso.

2. Justificativa

O conhecimento da participação da reação inflamatória, que se desenvolve após a administração do adjuvante é limitado pela ausência de estudos na área. Portanto, é importante estudar e compreender o possível papel da inflamação, na presença do adjuvante, ligado à eficiência da imunização. Este conhecimento poderá possibilitar a introdução de modificações no método de vacinação e/ou nos adjuvantes utilizados, ampliando a ação imunizante da vacina e reduzindo possíveis sequelas tais como: cicatrizes, granulomas e outros danos ao organismo humano e/ou animal.

A administração de adjuvantes, na maioria das vezes, é importante, pois se pode diminuir a dose necessária de antígeno, reduzindo os custos das vacinas (SINGH & O'HAGAN, 1999), pode aumentar a imunogenicidade do antígeno e ainda diminuir as doses necessárias de vacina.

Este estudo foi realizado através da avaliação da intensidade de infiltrado celular inflamatório induzido por adjuvantes, em bolhas de ar subcutâneas formadas em camundongos da linhagem *Swiss*.

3. Objetivos

3.1.Geral:

- Verificar a cinética de migração de células inflamatórias, induzida por seis formulações de adjuvantes, inoculados em bolhas de ar formadas no dorso (subcutâneo) de camundongos albinos da linhagem *Swiss*.

3.2.Específicos:

- Caracterizar quantitativamente a migração celular inflamatória induzida pela inoculação dos adjuvantes Avridine, Algamulin, Beta-glucana (2 e 4 mg), Hidróxido de Alumínio, SEPPIC-I e SEPPIC-II, através da contagem dos leucócitos infiltrados por Citometria de Fluxo;
- Avaliar qualitativamente as populações e subpopulações celulares presentes no infiltrado inflamatório através da contagem dos leucócitos por Citometria de Fluxo.

4. Metodologia

4.1. Animais:

No presente estudo foram utilizados camundongos *Mus musculus* albinos da linhagem *Swiss*, com aproximadamente 21 dias de idade, de ambos os sexos.

Os camundongos foram fornecidos pelo Biotério Central da UFSC e mantidos no Biotério do MIP sob condições adequadas e controladas.

4.2. Adjuvantes:

Neste estudo foram utilizadas formulações experimentais de vacina anti-rábica preparadas pela indústria Vallée S.A. (São Paulo) adicionada a 6 adjuvantes (Avridine, Algamulin, Beta-Glucana (2 e 4 mg), Hidróxido de Alumínio, SEPPIC-I e SEPPIC-II).

Avridine® é um amido lipídico sintético. É adicionado à vacina previamente adsorvida por hidróxido de alumínio, acrescida de conservante a agente anti-espuma. Ao final, forma-se uma emulsão óleo em água (RWEYEMAMU, 1986).

Hidróxido de Alumínio é o único adjuvante aprovado para uso em humanos.

Algamulin® é composto por gama inulina [β -D-(2→1) polifructofuranosil- α -D-glicose linear, como partículas na configuração polimórfica gama, em geral composta de 50 a 75 subunidades] e uma pequena porção de hidróxido de alumínio, suspensos em NaCl 0,8% e conservados com nitrato fenilmercúrico. Inulina é o carboidrato de reserva das plantas da família *Compositae*, e é extraído amplamente do caule de Dálías, principalmente no inverno, quando as cadeias de frutose são maiores (COOPER, 1995).

β -Glucana é uma microcápsula de carboidrato altamente purificada, composta por duas cadeias laterais de glicose (β 1,3/ β 1,6) ligadas à cadeia de glicose principal. É extraída principalmente a partir de paredes celulares de leveduras alimentares (*Saccharomyces cerevisiae*). No presente estudo foram utilizadas duas concentrações de β -Glucana (2mg e 4 mg).

SEPPIC-I® E *SEPPIC-II*® são formulações adjuvantes novas, não oleosas, produzidas pela empresa SEPPIC (Paris, França) cujas formulações são consideradas segredos industriais.

No grupo teste foram inoculados 100 µl de adjuvante adicionado de vacina anti-rábica, diluído em 900 µl de PBS (pH 7,4), com uma seringa (agulha 26G), e no grupo controle, 1000 µl de PBS (pH 7,4). Foi testada também a vacina pura (50µl de vacina diluída em 950µl de PBS pH 7,4).

4.3.Preparação das Bolhas Subcutâneas:

Foram inoculados, no dorso dos animais anestesiados (0,02 ml de cloridrato de cetamina), 3ml de ar com seringa estéril (agulha 26G) com a finalidade de formar uma bolha de ar subcutânea onde posteriormente foram coletadas as células inflamatórias. As bolhas foram preparadas 6 dias antes da inoculação do adjuvante (Bolha madura), através de duas inoculações de ar, sendo uma no dia zero e outra no dia três.

4.4.Isolamento do Infiltrado Inflamatório:

Cinco animais de cada grupo foram sacrificados com 0,3 ml de Cloridrato de quetamina em 2 tempos após o desafio (24 e 72 h). As bolhas subcutâneas foram lavadas com 2ml de uma solução contendo 5 mM EDTA em PBS (pH 7,4),o infiltrado inflamatório foi retirado com uma seringa (agulha 18G).

Foram retirados, deste infiltrado inflamatório 200µl e adicionado 100µl de Paraformaldeído a 4% + 200µl de PBS (pH 7,4). Estas amostras foram estocadas em geladeira para posterior análise em Citometria de fluxo.

4.5.Análise Qualitativa e Quantitativa do Infiltrado por Citometria de Fluxo (IMUNOFENOTIPAGEM):

Foi feita, primeiramente, a contagem por tamanho e granulidade diferenciando-se macrófagos, linfócitos e neutrófilos.

Para análise das subpopulações, as células foram marcadas com anticorpos, conjugados com fluoresceína ou ficoeritrina-R, anti-CD 45, anti-CD 19, anti-CD 3, anti-CD

4 e anti-CD8. Estes anticorpos são específicos para as populações de Leucócitos, Linfócitos B, Linfócitos T e sub-população de Linfócitos T, respectivamente. As suspensões de células foram marcadas conforme o protocolo da PharMingen®. Como controle utilizamos células não incubadas com anticorpos. Três áreas correspondentes a linfócitos, granulócitos e macrófagos foram estabelecidas, com base nos resultados das marcações dos leucócitos, associados aos resultados de granulocidade e tamanho.

Para a marcação com anticorpos monoclonais específicos primeiramente, o infiltrado inflamatório foi centrifugado 3 vezes a 1000 rpm por 8 minutos e o sedimento foi ressuspenso em 1 ml de uma solução de PBS (pH 7,4) + 50 μ M de EDTA + 2% de Soro de Camundongo + 1% Ovalbumina + 0,1% de Azida Sódica. Foi feita uma contagem em câmara de Neubauer e a concentração de células foi ajustada para 5×10^5 /ml. Foram retirados 50 μ l de células e adicionados à 15 μ l de anticorpo. A incubação foi de 1 hora em geladeira, protegido da luz.

Após o período de incubação, a amostra foi centrifugada 3 vezes a 1000 rpm por 8 minutos, sendo o sedimento ressuspenso em 200 μ l de PBS (pH 7,4). Ao final das lavagens foram adicionados 400 μ l de PBS (pH 7,4) + 100 μ l de paraformaldeído 4% . As amostras foram estocadas em geladeira por no máximo uma semana, protegidas da luz para posterior análise no Citômetro de Fluxo FACSCalibur (Becton Dicknson) do Laboratório de Marcadores Celulares do HEMOSC (Florianópolis SC).

5. Considerações Éticas

Dada a utilização de animais nos experimentos descritos, este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC no dia 17/04/01 (protocolo: 057/CEUA 23080.001031/2001-20).

6. Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada com auxílio do teste ANOVA para medidas de repetição, considerando-se estatisticamente significativos os valores de $p \leq 0,05$.

7. Resultados

A contagem celular é tradicionalmente realizada por método manual com a câmara de Neubauer, porém resolveu-se investigar a possibilidade do uso da citometria de fluxo para esse objetivo. Para isto, testou-se o método através da análise da concentração celular de cada amostra, controle e teste, pela contagem de eventos totais obtidos pelo Citômetro de Fluxo em 15 ou 30 segundos. Fez-se análise nos pontos de 24 e 72 horas após o inóculo.

Neste estudo observou-se que todos os adjuvantes induzem migração celular para interior da bolsa de ar. Indiretamente, acredita-se que esta migração ocorre também na pele quando os mesmos são injetados diretamente subepidemicamente.

7.1 Análise qualitativa e quantitativa do infiltrado por tamanho e granulidade através da Citometria de Fluxo:

7.1.1 Migração Celular: Na contagem total de leucócitos por citometria de fluxo, SEPPIC-I e SEPPIC-II mostraram uma indução no aumento da celularidade nas primeiras 24 horas, que tendeu a diminuir até 72 horas de inflamação. Avridine mostrou um aumento progressivo durante as 72 horas de observação. Os demais adjuvantes mostraram uma indução de celularidade nas primeiras 24 horas menor que os acima e uma diminuição desta após 72 horas. Apenas os resultados dos adjuvantes SEPPIC-I, SEPPIC-II e Avridine foram significativos estatisticamente nos dois pontos de análise (Fig. 1).

Os resultados de FSC (Forward Scatter Counter) x SSC (Side Scatter Counter) no citômetro de fluxo demonstraram a presença de três grupos de células (Fig. 2). Avaliou-se o infiltrado neutrofílico, macrofágico e linfocítico em 24 e 72 horas. Esses acúmulos celulares estavam presentes tanto no grupo controle como nos grupos experimentais, e se mantiveram presentes nos dois pontos de análise.

Os adjuvantes Avridine, SEPPIC-I e SEPPIC-II apresentaram um predomínio de macrófagos no infiltrado inflamatório durante todos os pontos observados. Os adjuvantes Beta-Glucana (2mg e 4mg), Hidróxido de Alumínio e Algamulin, após 72 horas de observação, mostraram predomínio de macrófagos e neutrófilos no sítio inflamatório, sendo

que Beta-Glucana 2mg, Hidróxido de Alumínio e Algamulin induziram um aumento na população neutrofílica após 24 horas de inflamação. O adjuvante SEPPIC-II também mostrou um aumento na população neutrofílica (Tabela 1).

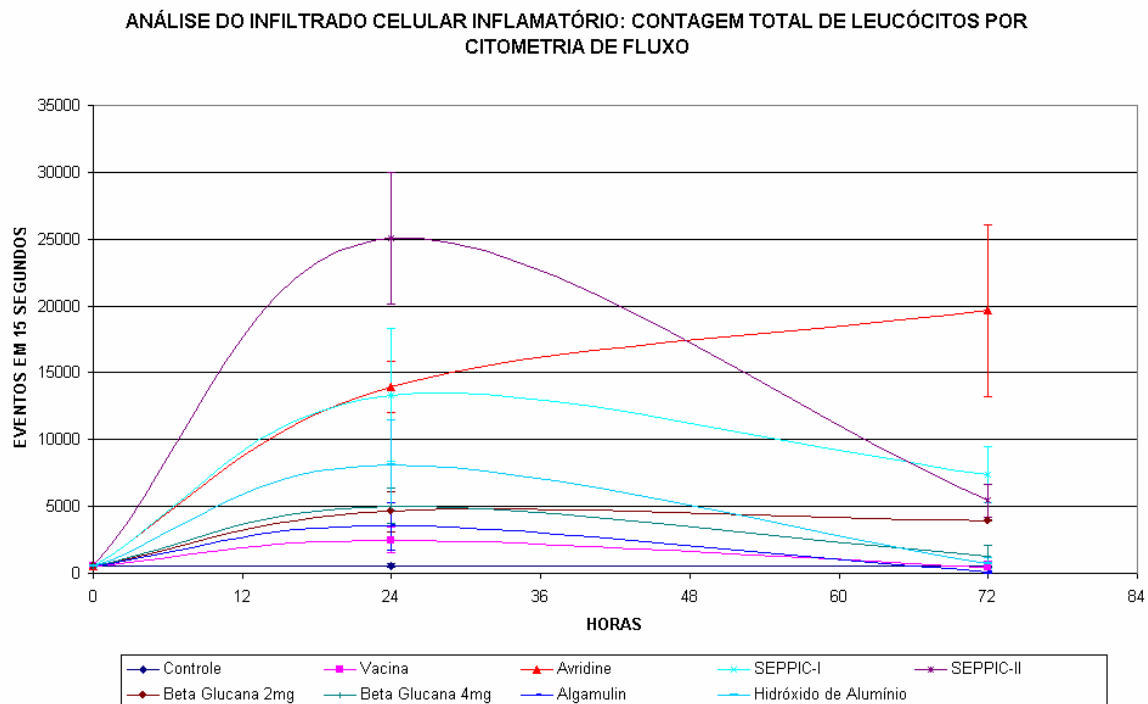


Fig. 1: Análise do Infiltrado Celular Inflamatório por Contagem de Células Totais em Citometria de Fluxo. As células obtidas do exsudato foram analisadas por citometria de fluxo em 15 segundos contínuos. [F(16,18)=14,24; p< ,000] (n=20).

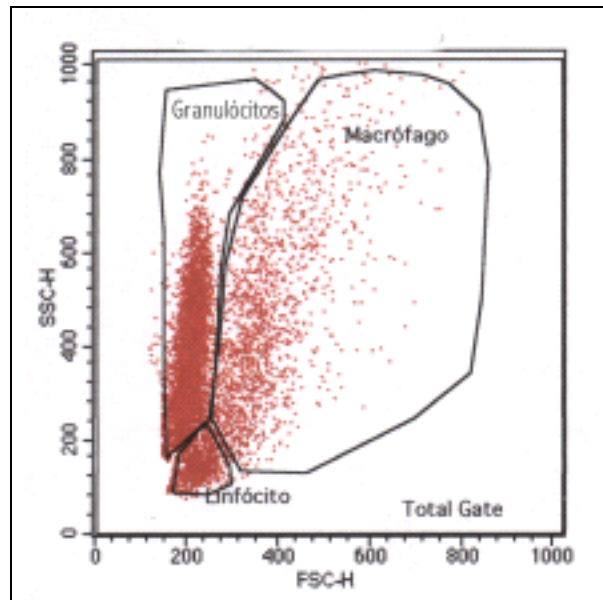


Fig. 2. Exemplo de um resultado da citometria de fluxo de uma amostra de exsudato da cavidade da bolha de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem *Swiss*. As células obtidas do exsudato foram adquiridas por citometria de fluxo em 15 segundos contínuos. O resultado observado é exemplo de como as determinações das subpopulações foram feitas.

Análise, por tamanho e granulosidade, do infiltrado celular inflamatório pela contagem das subpopulações leucocitárias por Citometria de Fluxo.

	24h			72h		
	Linfócitos	Macrófagos	Granulócitos	Linfócitos	Macrófagos	Granulócitos
Controle	2	83	15	7	82	11
Avridine	27	54	19	6	63	31
SEPPIC-I	1	93	6	1	96	3
SEPPIC-II	1	97	2	6	75	19
B.Glucana 2mg	2	72	26	5	47	48
Beta Glucana 4mg	0	56	44	2	67	31
H.Alumínio	0	85	15	1	62	37
Algamulin	1	79	20	8	45	47

Tabela 1: Proporção das Subpopulações Leucocitárias obtida através da Aquisição por Citometria de Fluxo em 15 segundos. (n=20).

7.2 Análise qualitativa do infiltrado por Citometria de Fluxo confirmadas pelos marcadores celulares de superfície:

Após análise quantitativa e qualitativa baseada no tamanho e granulosidade das células, uma avaliação mais específica, utilizando marcação com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos também foi realizada.

7.2.1 Granulócitos: Ao analisar as populações celulares de granulócitos, observou-se diferença entre o grupo controle e os grupos experimentais nos dois pontos de observação (24 e 72h). Mas apenas no desafio com o adjuvante Avridine observou-se um aumento significativo no número dessas células em função do tempo, com tendência de crescimento contínuo nas primeiras 24 horas se estendendo até as 72 horas de observação. No ponto de 72 horas, os valores de granulócitos foram 17000 vezes maiores que os verificados no grupo controle, e a maior concentração granulocítica foi atingida. Foram estatisticamente significativos somente os resultados do adjuvante Avridine (Fig. 3).

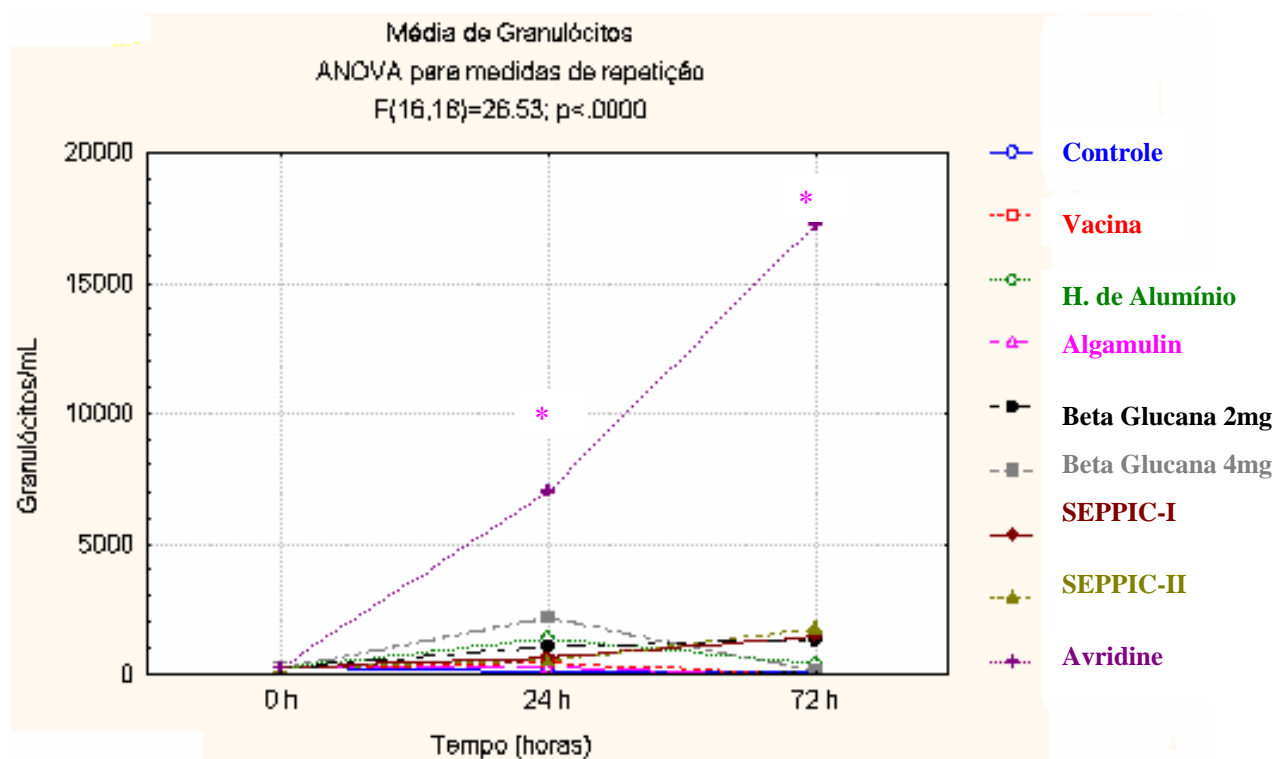


Fig. 3: Cinética de migração granulocítica. O número de granulócitos foi determinado pela citometria de fluxo em 30 segundos contínuos presentes em uma área específica correspondente aos granulócitos a partir do exsudato presente no interior da bolha. Os resultados de Avridine são estatisticamente significativos. A área correspondente a granulócitos foi estabelecida através da marcação com anticorpo anti-CD45, (n=12).

7.2.2 Macrófagos: A evolução da população macrofágica no interior da bolsa de ar demonstrou um aumento nas primeiras 24 horas de observação em todos os grupos, sendo estatisticamente significativo apenas nos adjuvantes Avridine, SEPPIC-I e SEPPIC-II. Após as 24 horas ocorre gradual diminuição da concentração celular em todos os grupos, exceto no grupo desafiado com o adjuvante Avridine que mostrou um incremento nesta população celular até as 72 horas de observação (Fig. 4).

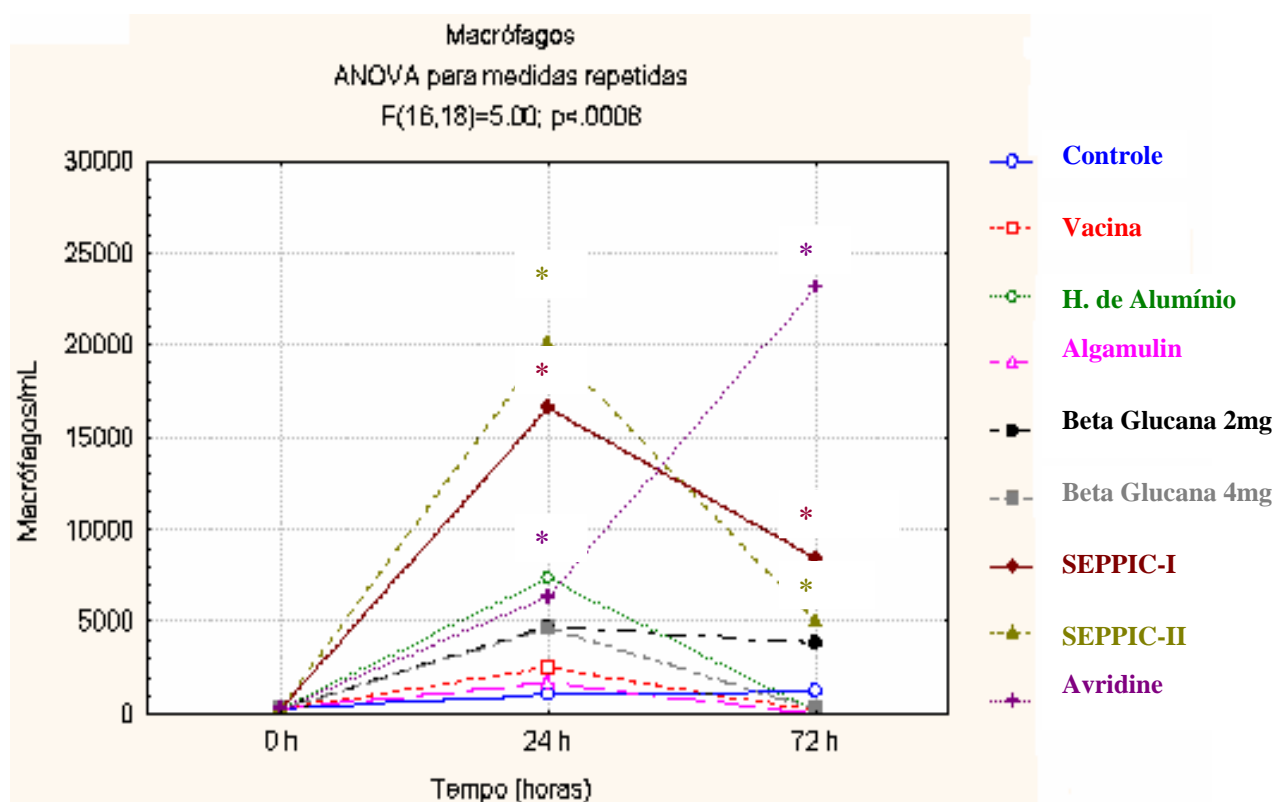


Fig. 4: Cinética de migração macrofágica. O número de células foi determinado pela citometria de fluxo em 30 segundos contínuos presentes em uma área específica correspondente aos macrófagos a partir do exsudato presente no interior da bolsa. Os resultados de Avridine, SEPPIC-I e SEPPIC-II são estatisticamente significativos. A área correspondente a macrófagos foi estabelecida através da marcação com anticorpo anti-CD45 (n=12).

7.2.3 Linfócitos (T CD4+,T CD8+,B CD19+): O comportamento da população linfocitária assemelha-se à das outras células estudadas, com aumento no número desse tipo de célula na cavidade da bolha de ar subcutânea nos grupos teste em relação ao controle. Essa tendência de incremento da população linfocitária está mais presente no grupo desafiado com o adjuvante Avridine após as 24 horas de observação se estendendo até as 72 horas. A concentração de linfócitos é 10000 vezes maior no grupo experimental Avridine que no controle (Fig. 5). O adjuvante Avridine induz uma maior migração linfocitária comparada com os outros. Esta migração é causada pelo o influxo de linfócitos T CD4 e T CD8 não observada nos outros adjuvantes (Fig. 6 e Fig. 9). O número absoluto de Linfócitos B CD19 diminuiu após as 72 horas de observação, na cavidade da bolha, nos animais desafiados com Avridine (Fig.12).

Os adjuvantes Algamulin, Beta Glucana 4 mg e SEPPIC-I apresentaram uma proporção maior de linfócitos T CD4 nas primeiras 24 horas (Fig. 7, Fig. 8, Tabela 2); já os adjuvantes Hidróxido de Alumínio e SEPPIC-II mostraram uma proporção maior de linfócitos T CD8 nas primeiras 24 horas (Fig. 10, Fig. 11, Tabela 2); o adjuvante Beta Glucana 2 mg apresentou uma proporção de 1:1 (Fig. 8, Fig. 11, Tabela 2). Observando a proporção de linfócitos B CD19, pudemos notar que os adjuvantes Hidróxido de Alumínio, Beta Glucana 2 e 4 mg , SEPPIC-I e II mostraram um número maior nas primeiras 24 horas que tendeu a diminuir nas 72 horas, o contrário de Algamulin que apresentava uma proporção menor de CD19 24 horas após e que tendeu a aumentar 72 horas após (Fig. 13, Fig. 14, Tabela 2). Todos estes resultados não foram significativos estatisticamente.

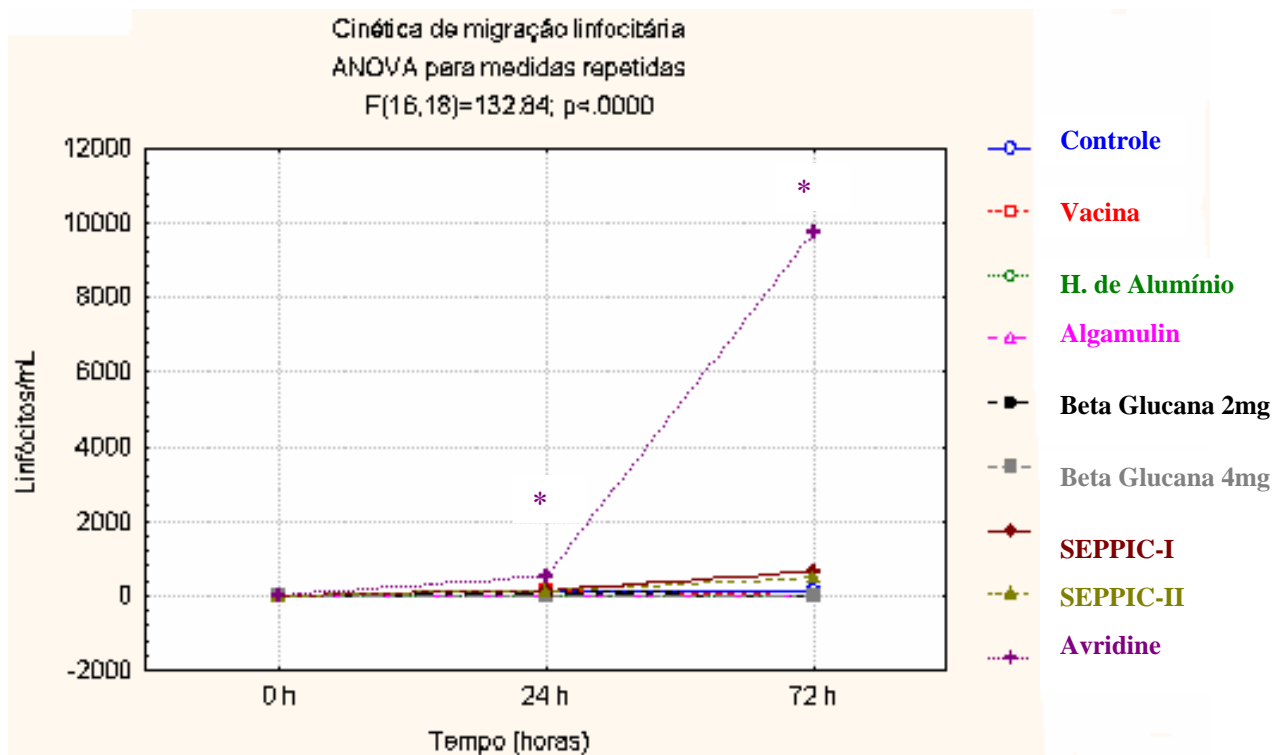


Fig. 5: Cinética de migração linfocitária. O número de linfócitos foi determinado pela citometria de fluxo em 30 segundos contínuos presentes em uma área específica correspondente aos linfócitos a partir do exsudato presente no interior da bolha. Os resultados de Avridine são estatisticamente significativos. A área correspondente a linfócitos foi estabelecida através da marcação com anticorpo anti-CD3 (n=12).

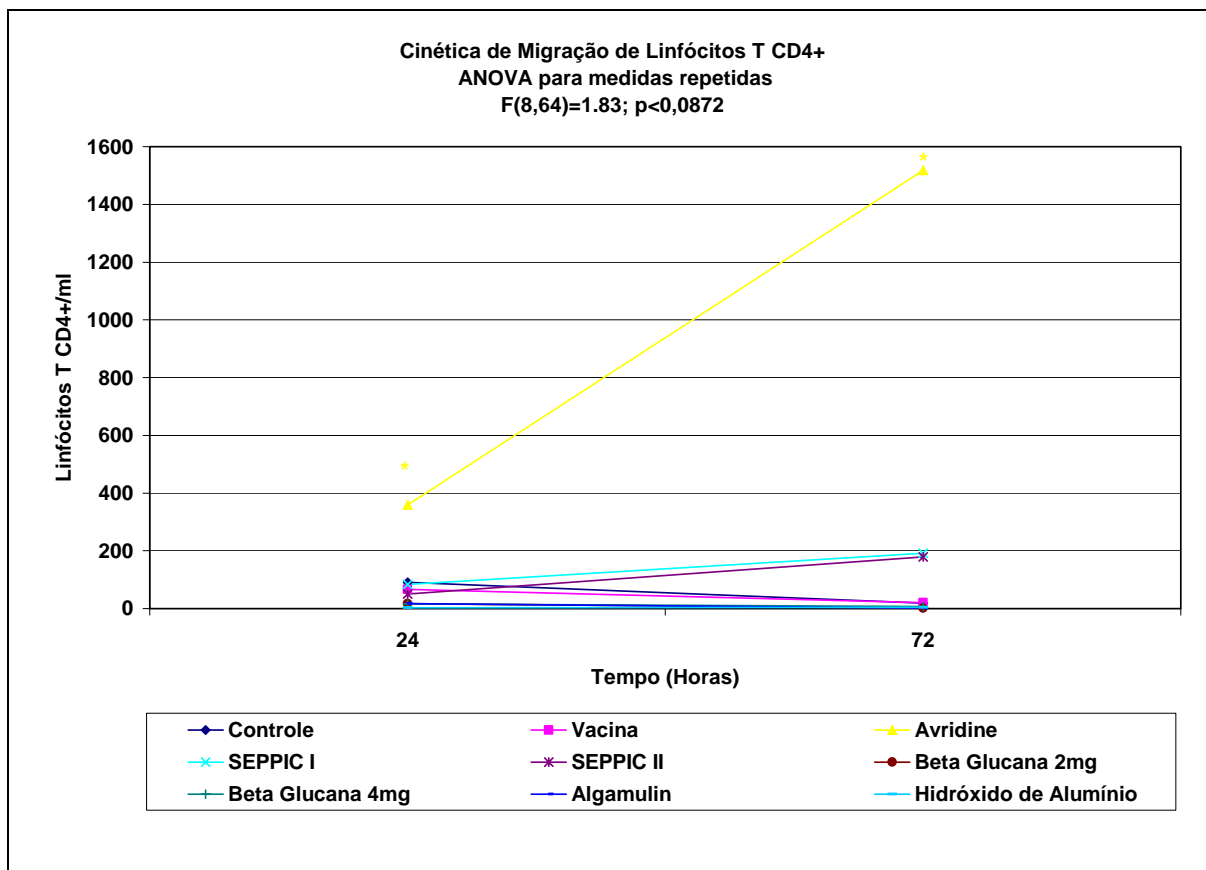


Fig. 6: Cinética de migração de linfócitos T CD4+. O número de linfócitos foi determinado pela citometria de fluxo em 30 segundos contínuos presentes em uma área específica correspondente aos linfócitos T CD4 a partir do exsudato presente no interior da bolha. População celular marcada com anticorpo anti-CD4. O asterisco indica diferença significativa entre o grupo controle e o experimental. (n=12).

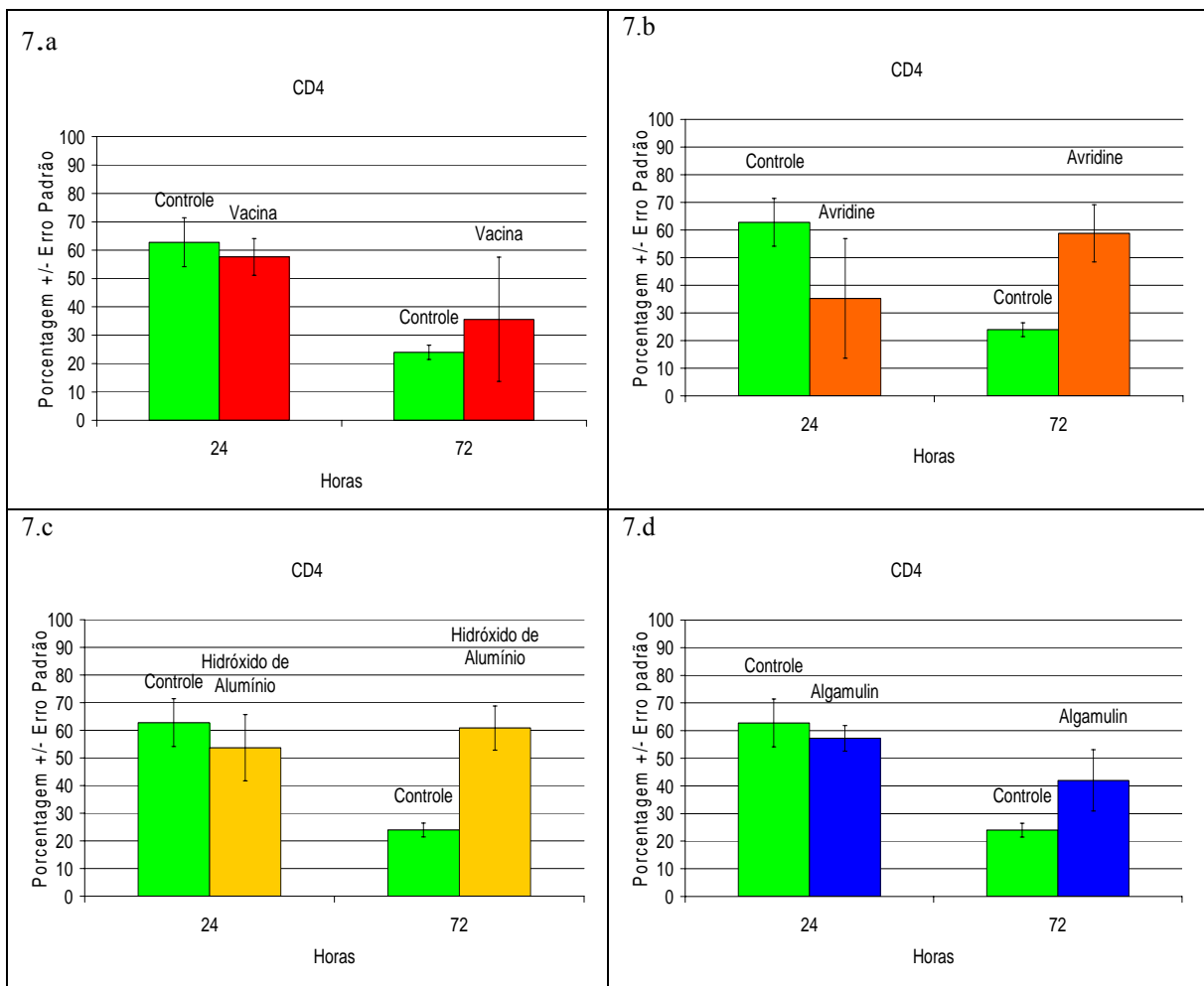


Fig. 7: Curso da infiltração de linfócitos T CD4 na bolsa de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem *Swiss* submetidos ou não ao desafio com adjuvante. O número de células foi determinado pela citometria de fluxo em 30 segundos contínuos a partir do exsudato presente no interior da bolha. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de seis experimentos. 7.a: Controle x Vacina; 7.b: Controle x Avridine; 7.c: Controle x Hidróxido de Alumínio; 7.d: Controle x Algamulin. (n=12).

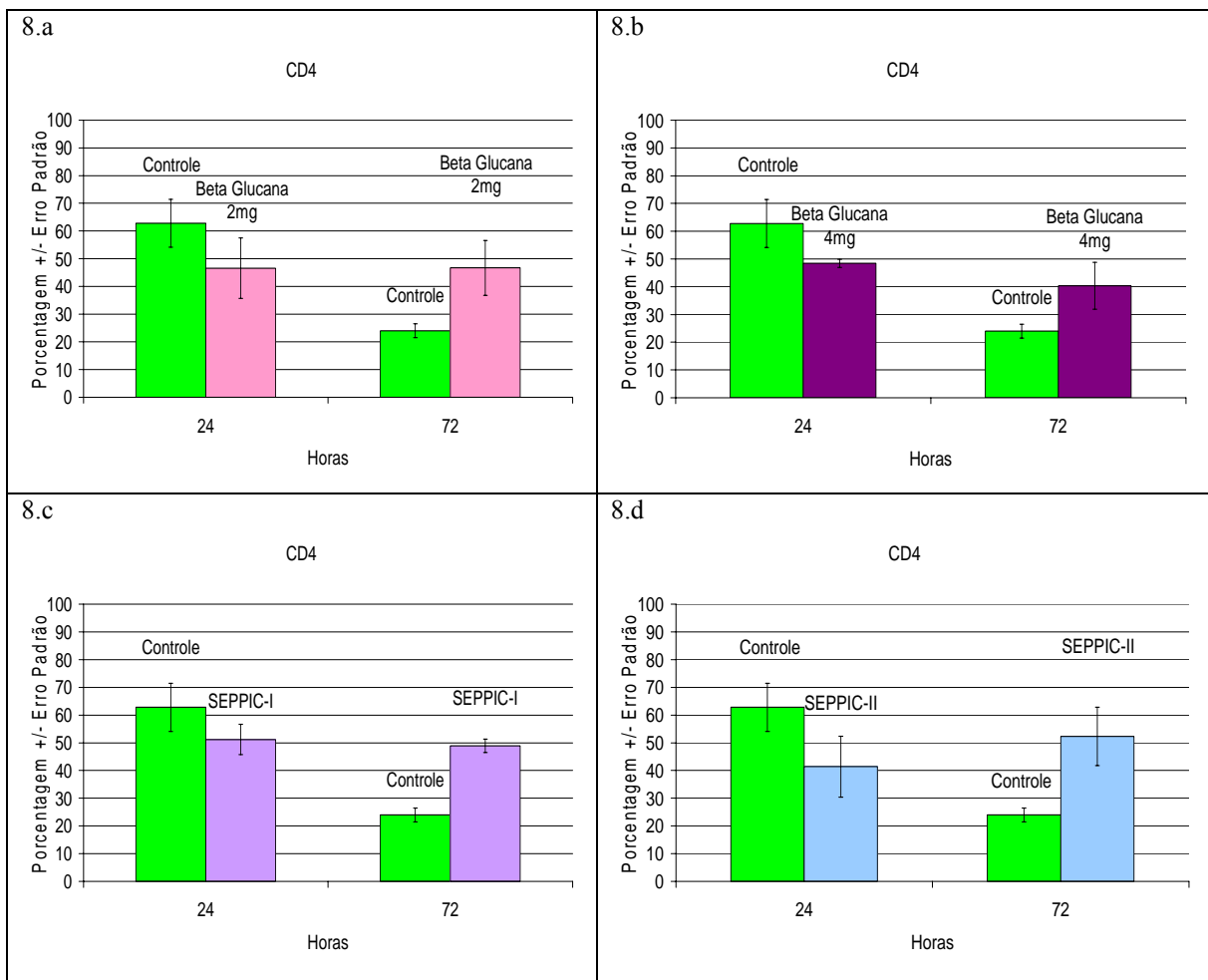


Fig. 8: Curso da infiltração de linfócitos T CD4 na bolsa de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem *Swiss* submetidos ou não ao desafio com adjuvante. O número de células foi determinado pela citometria de fluxo em 30 segundos contínuos a partir do exsudato presente no interior da bolha. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de seis experimentos. 8.a: Controle x Beta Glucana 2mg; 8.b: Controle x Beta Glucana 4mg; 8.c: Controle x SEPPIC-I; 8.d: Controle x SEPPIC-II. (n=12).

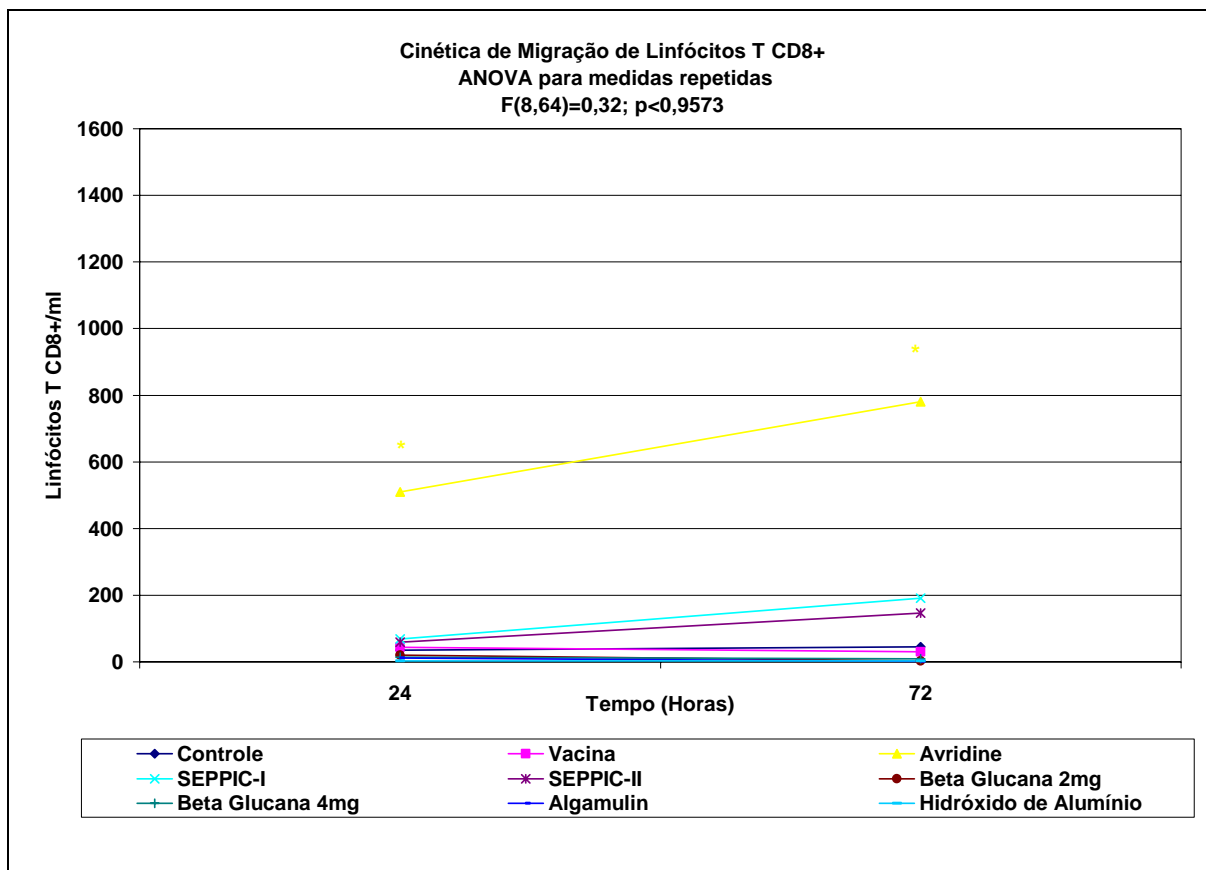


Fig. 9: Cinética de migração de linfócitos T CD8+. O número de linfócitos foi determinado pela citometria de fluxo em 30 segundos contínuos presentes em uma área específica correspondente aos linfócitos T CD8 a partir do exsudato presente no interior da bolha. População celular marcada com anticorpo anti-CD8. O asterisco indica diferença significativa entre o grupo controle e o experimental (n=12).

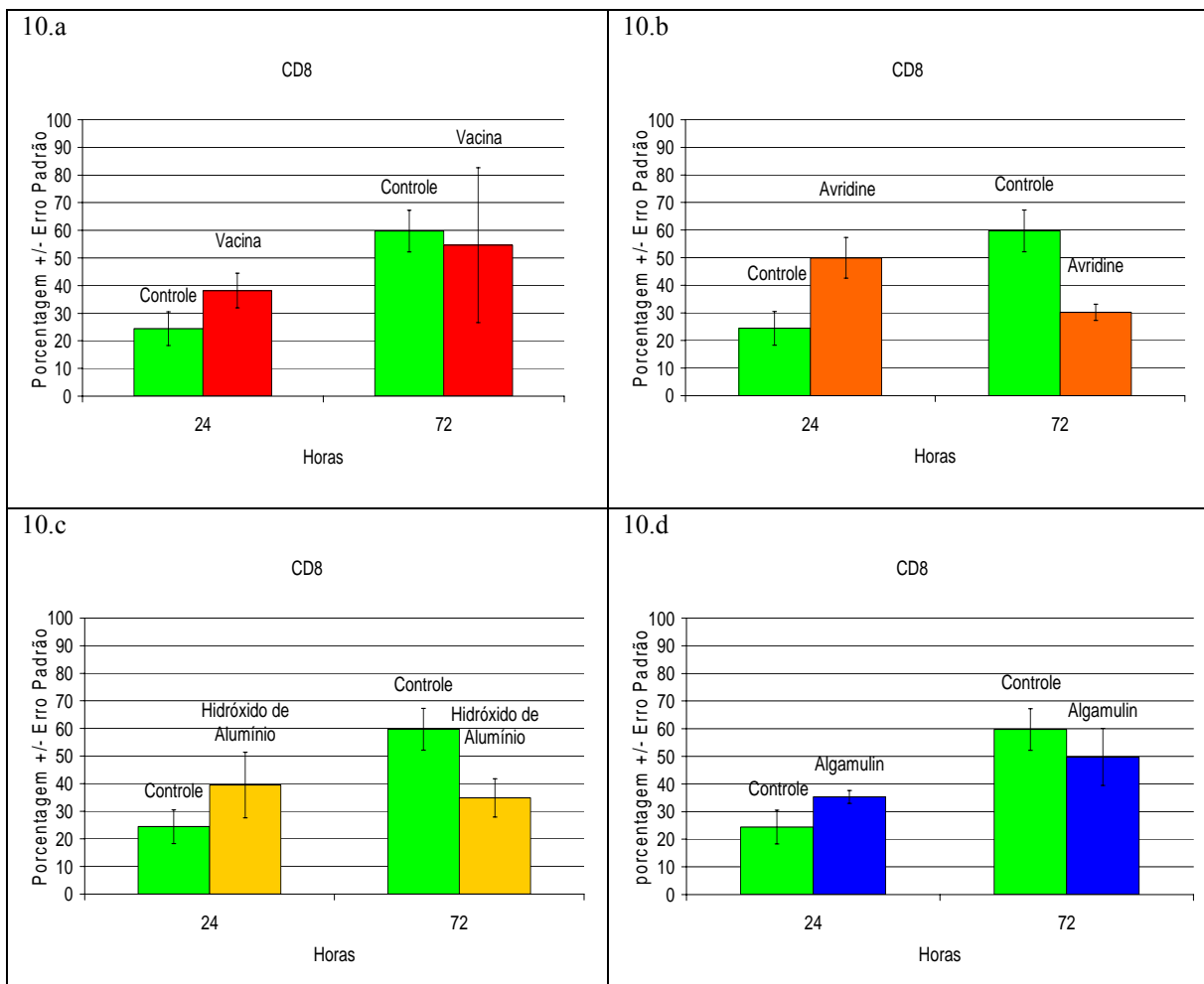


Fig. 10: Curso da infiltração de linfócitos T CD8 na bolsa de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem *Swiss* submetidos ou não ao desafio com adjuvante. O número de células foi determinado pela citometria de fluxo em 30 segundos contínuos a partir do exsudato presente no interior da bolha. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de seis experimentos. 10.a: Controle x Vacina; 10.b: Controle x Avidine; 10.c: Controle x Hidróxido de Alumínio; 10.d: Controle x Algamulin. (n=12).

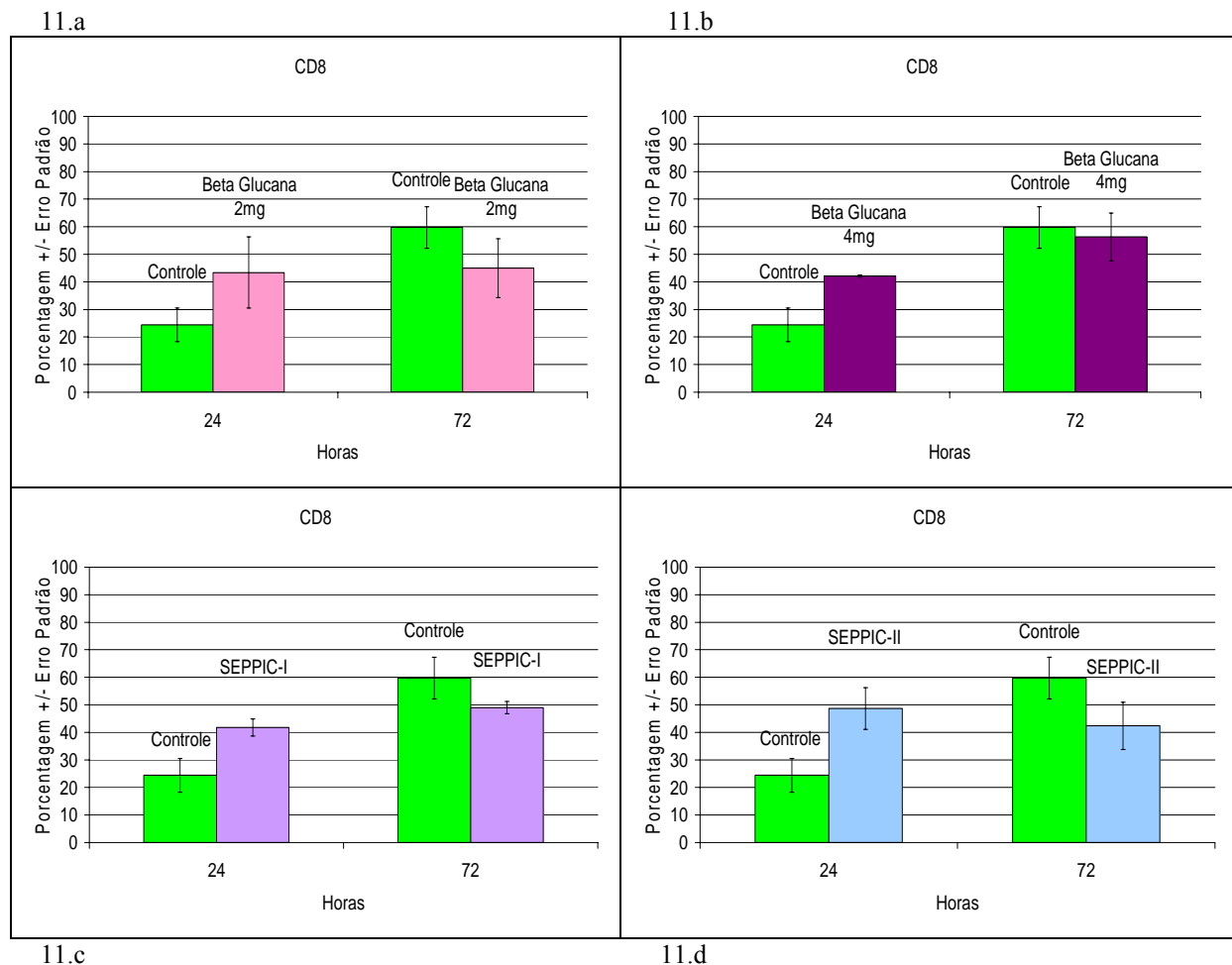


Fig. 11: Curso da infiltração de linfócitos T CD8 na bolsa de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem *Swiss* submetidos ou não ao desafio com adjuvante. O número de células foi determinado pela citometria de fluxo em 30 segundos contínuos a partir do exsudato presente no interior da bolha. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de seis experimentos. 11.a: Controle x Beta Glucana 2mg; 11.b: Controle x Beta Glucana 4mg; 11.c: Controle x SEPPIC-I; 11.d: Controle x SEPPIC-II. (n=12).

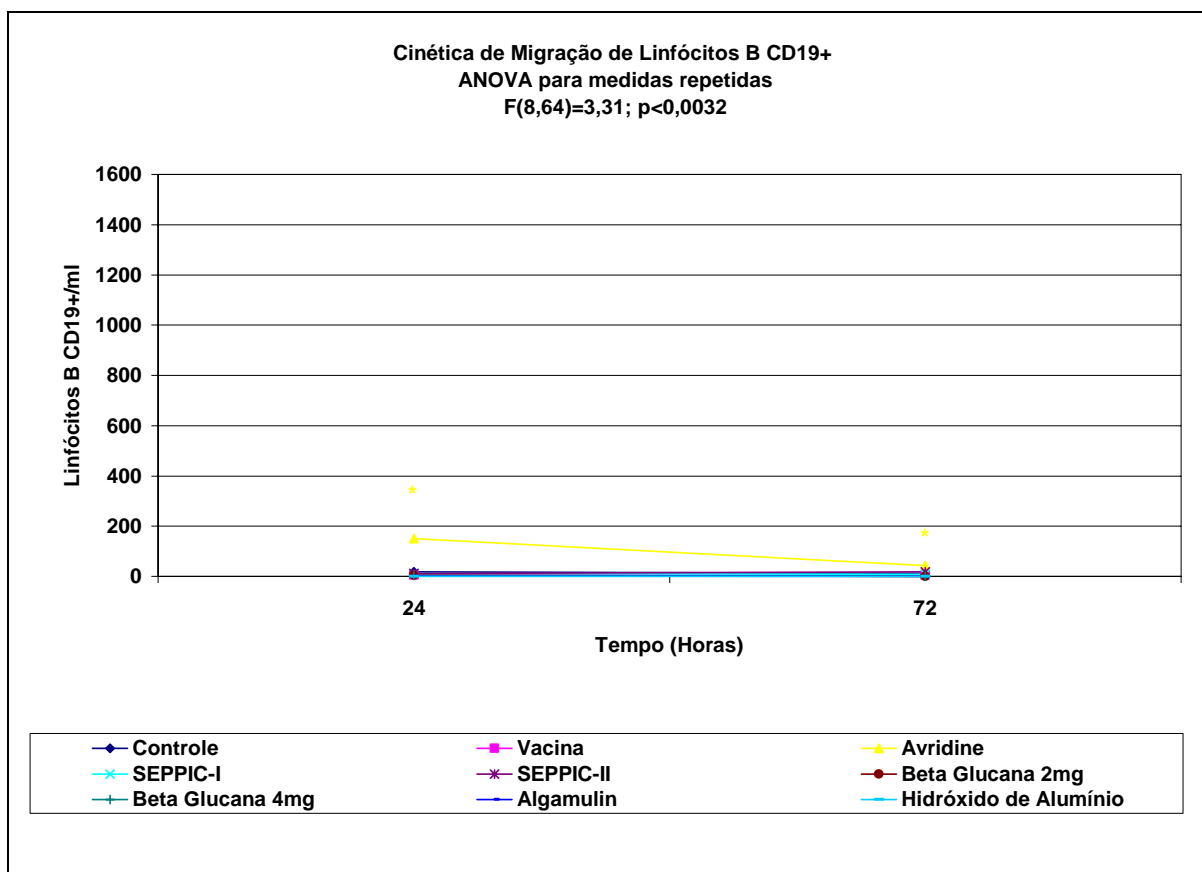


Fig. 12: Cinética de migração de linfócitos B CD19+. O número de linfócitos foi determinado pela citometria de fluxo em 30 segundos contínuos presentes em uma área específica correspondente aos linfócitos B CD19 a partir do exsudato presente no interior da bolha. População celular marcada com anticorpo anti-CD19. O asterisco indica diferença significativa entre o grupo controle e o experimental (n=12).

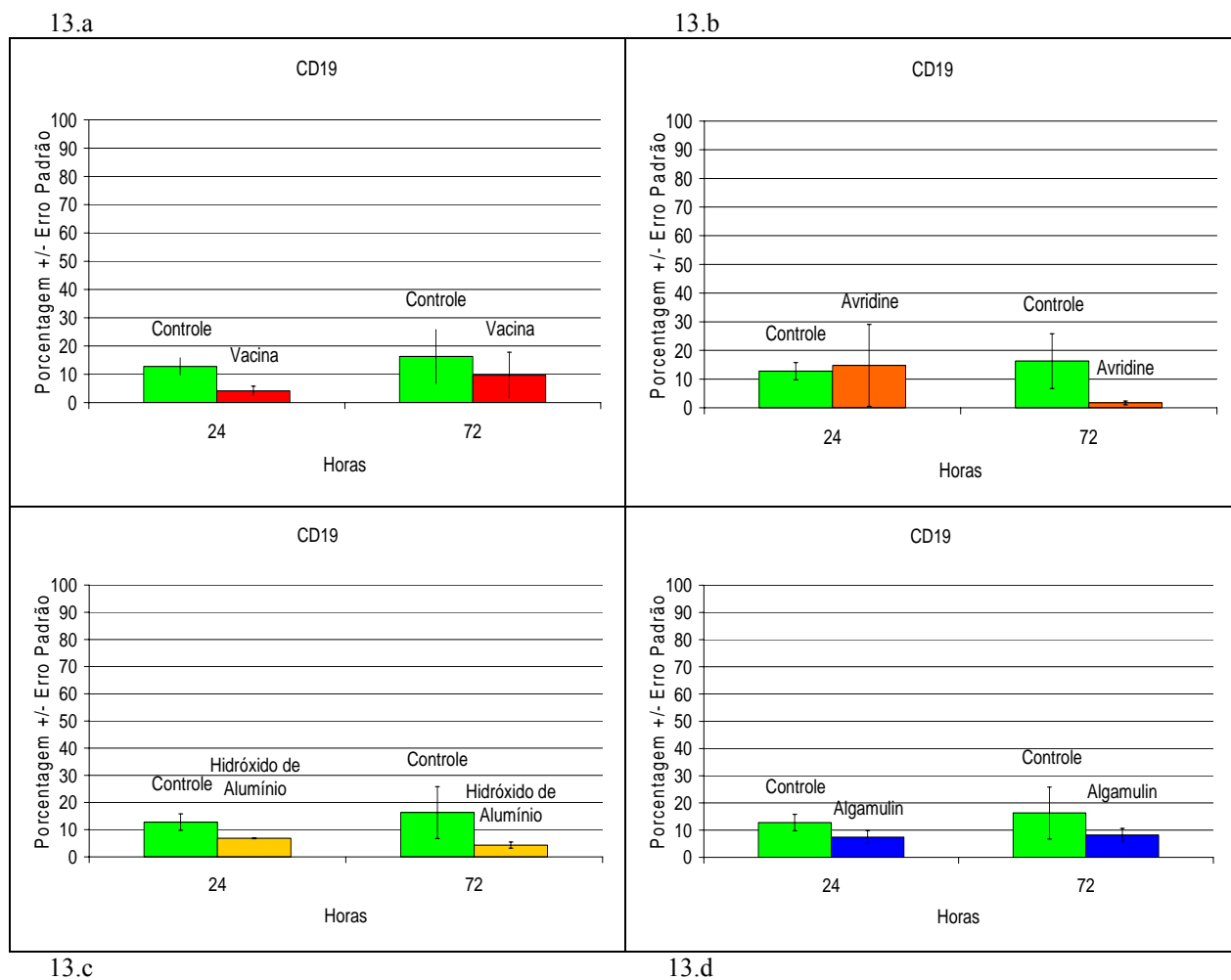


Fig. 13: Curso da infiltração de linfócitos B CD19 na bolsa de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem *Swiss* submetidos ou não ao desafio com adjuvante. O número de células foi determinado pela citometria de fluxo em 30 segundos contínuos a partir do exsudato presente no interior da bolha. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de seis experimentos. 13.a: Controle x Vacina; 13.b: Controle x Avridine; 13.c: Controle x Hidróxido de Alumínio; 13.d: Controle x Algamulin. (n=12).

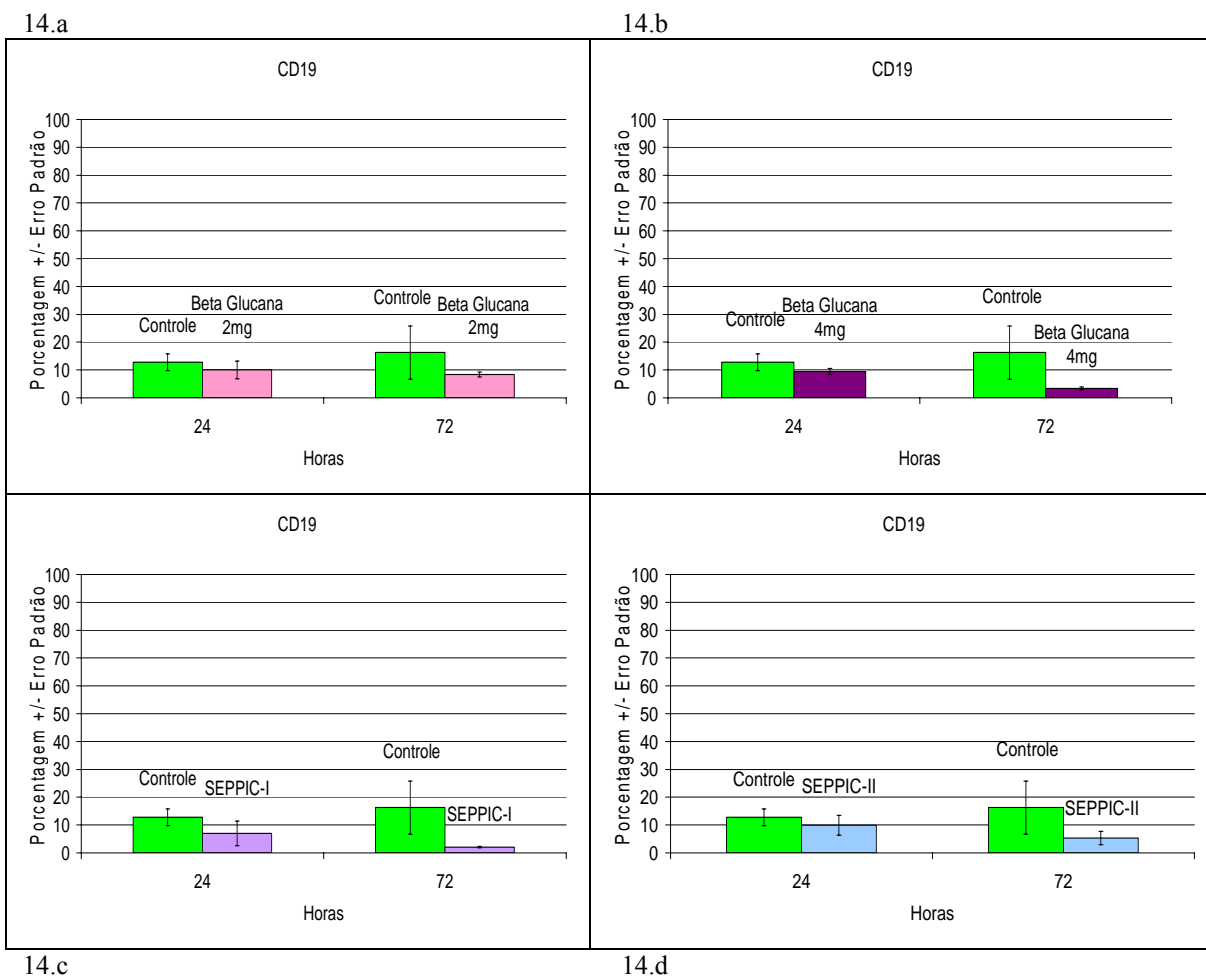


Fig. 14: Curso da infiltração de linfócitos B CD19 na bolsa de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem *Swiss* submetidos ou não ao desafio com adjuvante. O número de células foi determinado pela citometria de fluxo em 30 segundos contínuos a partir do exsudato presente no interior da bolha. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de seis experimentos. 14.a: Controle x Beta Glucana 2mg; 14.b: Controle x Beta Glucana 4mg; 14.c: Controle x SEPPIC-I; 14.d: Controle x SEPPIC-II. (n=12).

Grupos Teste	CD 4	CD 8	CD 19
Controle 24h	62,78	24,40	12,82
Controle 72h	23,97	59,72	16,30
Vacina 24h	57,62	38,19	4,17
Vacina 72h	35,61	54,62	9,69
Avridine 24h	35,26	49,94	14,79
Avridine 72h	58,79	30,22	1,69
H. Alumínio 24h	53,68	39,52	6,80
H. Alumínio 72h	60,84	34,85	4,32
Algamulin 24h	57,22	35,34	7,44
Algamulin 72h	42,01	49,78	8,21
Beta-Glucana 2mg 24h	46,57	43,39	10,04
Beta-Glucana 2mg 72h	46,68	44,96	8,36
Beta-Glucana 4mg 24h	48,43	42,10	9,45
Beta-Glucana 4mg 72h	40,35	56,27	3,36
SEPPIC-I 24h	51,20	41,79	7,00
SEPPIC-I 72h	48,91	49,00	2,08
SEPPIC-II 24h	41,38	48,68	9,93
SEPPIC-II 72h	52,25	42,38	5,36

Tabela 2: Proporção de Linfócitos. Curso da infiltração de linfócitos T CD4, TCD8 e TCD19 na bolsa de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem *Swiss* inoculados ou não com adjuvante. O número de células foi determinado pela citometria de fluxo em 30 segundos contínuos a partir do exsudato presente no interior da bolha. (n=12).

8. Discussão

Com as melhorias nas vacinas e o progresso nas técnicas de purificação de antígenos, existe um crescimento na necessidade de adjuvantes apropriados que efetivamente potencializem a resposta imune a antígenos fracos. Infelizmente, a absoluta segurança dos adjuvantes, na maioria das vezes, não pode ser garantida (GOTO *et al*, 1993).

Atualmente, as substâncias adjuvantes têm recebido muita atenção devido a sua habilidade de modular seletivamente a resposta imune humoral ou a resposta imune celular (GOLDING, 1991; SPRIGGS, 1991; AUDIBERT, 1993; COOPER, 1994).

Durante os últimos 15 anos, obteve-se muito progresso no desenvolvimento, isolamento e síntese química de substâncias adjuvantes alternativas, como derivados de muramil dipeptídeo, monofosforil lipídeo A, lipossomos e complexos imunoestimulantes (ISCOMS) (GUPTA, 1995), mas pouco se estudou sobre os efeitos destas substâncias na resposta imunológica (inflamatória) ao antígeno específico, principalmente a resposta celular, e de que forma esta resposta pode auxiliar a performance da vacina, quanto à indução de uma resposta eficiente, desenvolvimento de uma resposta protetora, não hipersensibilizante e segura.

Desta forma, é importante o estudo do processo inflamatório que se inicia após o desafio com o adjuvante e leva a formação de uma resposta imune protetora. Poucos modelos experimentais foram utilizados e analisados com o objetivo de avaliar a resposta inflamatória celular induzida pelo adjuvante. Esta resposta participa da determinação de uma resposta imune predominantemente celular ou humoral dependendo do perfil de citocinas produzidas no sítio inflamatório.

O presente estudo foi desenhado para examinar vários parâmetros relacionados ao processo inflamatório celular que se instala após o desafio com o adjuvante em um animal de experimentação.

Utilizou-se como ponto de partida o modelo descrito por EDWARDS *et al.*, 1981 para produção das bolsas de ar subcutâneas e análise do exsudato inflamatório em seu interior, para com ele criar um modelo de estudo do modo de ação dos adjuvantes sobre um animal saudável. Em outros estudos, este modelo tem sido usado extensamente para análise

da resposta inflamatória experimental (DE SOUZA, 2000), mas não no modelo de análise de celularidade em animais desafiados com substâncias adjuvantes.

A Citometria de Fluxo foi utilizada como ferramenta importante para a análise da celularidade total e de suas subpopulações.

Por razões logísticas e técnicas, decidiu-se utilizar camundongos de linhagem não-isogênica do tipo *Swiss*. A escolha de uma linhagem não-isogênica poderia mostrar uma variabilidade ideal para os objetivos desta pesquisa. O modelo de camundongo, embora não tão freqüente no estudo dos processos inflamatórios (o mais comum é o rato), apresenta a vantagem do uso de anticorpos monoclonais disponíveis para determinação das subpopulações celulares (DE SOUZA, 2000).

Uma vez que o objetivo deste trabalho era o estudo da inflamação aguda induzida pelos adjuvantes foram seguidos alguns critérios para decisão dos pontos temporais a serem analisados. Em geral, os estudos sobre a evolução da inflamação revelam um pico de exsudato nas primeiras 24 horas, seguido por resposta separada de mononucleares, formação de um denso exsudato e granuloma nos 2 a 7 dias seguintes (HAMBLETON & MILLER, 1988). Considerando que classicamente os eventos da inflamação aguda ocorrem em 72 horas (WHYTE *et al.*, 1996), era possível que as modificações relacionadas com o adjuvante estivessem presentes nesse espaço de tempo.

Embora muitos pesquisadores se concentrem na análise do perfil de citocinas para estudar inflamação (COHEN, 1976; DUNN *et al.*, 1989; BERG *et al.*, 1995), o estudo da celularidade tem sua importância, uma vez que ela é um indicador de processo inflamatório, o que foi demonstrado por STWART *et al.* (1984), com relação a neutrofilia peritoneal como potencial indicador de inflamação desse órgão. Outro argumento a corroborar a alteração da celularidade como indicador de inflamação vem do trabalho de BONE, (1996) que define, entre outros conceitos, a contagem leucocitária sanguínea como critério de sepse. Segundo LUSTER (1998), em ambos os casos, as citocinas, principalmente as quimiocinas, devido à sua produção pelas células envolvidas no processo de injúria, são responsáveis pelas alterações quantitativas e qualitativas no exsudato inflamatório. Ou seja, a importância do estudo da celularidade se justifica quando se considera que as células produzem e consomem as citocinas inflamatórias resultantes do processo, e se modificam com elas (DE SOUZA, 2000).

Um dos adjuvantes utilizados neste estudo foi o Hidróxido de Alumínio. Esta substância tem sido largamente utilizada na prática de vacinas há algum tempo. É atualmente o único adjuvante autorizado para uso em humanos e é também utilizado em vacinas veterinárias. No Japão, o Hidróxido de Alumínio é utilizado em vacinas humanas como, Tétano, combinada de Tétano e Difteria, combinada de Difteria (purificada) Pertussis e Tétano, Hepatite B, entre outras e vacinas veterinárias como, Newcastle, Febre Efêmera, Haemophilus e Encefalite japonesa. Porém, muitos estudos têm evidenciado a neurotoxicidade de componentes de alumínio, relacionada a doenças como Alzheimer e encefalopatias (GOTO *et al.*,1993).

Neste estudo foi observado que este adjuvante induziu um aumento na migração macrofágica e neutrofílica para o sítio de inoculação (Tabela 1). Isto pode explicar o fato que dentre os efeitos colaterais do uso deste adjuvante temos o eritema, nódulos subcutâneos, hipersensibilidade de contato e inflamação granulomatosa. Por outro lado, apresenta pequena ou nenhuma toxicidade sistêmica (PASSOLD, 2001). Houve alteração, embora não constante, nos diferentes pontos de análise, das proporções de células T CD8+ (aumento em 24h) e T CD4+ (aumento em 72h) (Tabela 2). GOTO *et al.* (1993) mostraram que o Hidróxido de Alumínio induziu um aumento da permeabilidade vascular associado a um efeito tóxico sobre macrófagos. A redução na capacidade de estimular resposta celular pode ser explicada pelo retardo na presença de linfócitos T CD4+ no infiltrado inflamatório observada neste estudo. O Hidróxido de Alumínio não é eficaz com todos os antígenos, e estimula principalmente imunidade humoral, sendo muito pobre a indução de resposta mediada por célula (SCHIRMBECK, 1994). HARRIS *et al.* (1996) observaram uma redução na capacidade de indução de resposta citotóxica devido a uma inibição de acesso antigênico a MHC de classe I, estes dados podem estar associados à observação que há uma progressiva redução dos linfócitos T CD8+ no infiltrado após 72 horas de estimulação (Tabela 2).

Já os linfócitos B só aumentaram no ponto de 24h (Tabela 2). Tais resultados podem ser parcialmente associados as seguintes observações. Hidróxido de Alumínio induz resposta imunológica do tipo Th2 (T *helper* 2), associada com a produção de interleucina 4 e anticorpos IgG1, IgE e IgA secretória (MOSMAN & COFFMAN, 1989). Tem sido utilizado em vacinas experimentais anti-HIV, aumentando a produção específica de

anticorpos (POWEL, 1995; HART, 1990). Desta forma o antígeno propriamente dito e o adjuvante podem estimular diferentes vias da resposta inflamatória. O adjuvante estimula células T, talvez mais predominantemente Th2 (HARRIS, 1992), enquanto partículas não associadas ao adjuvante podem estimular outro tipo de resposta (HARRIS, 1996). O predomínio de resposta Th2 deve ser responsável pelas observações que o Hidróxido de Alumínio atrai eosinófilos para o local de inoculação da vacina, e estimula a produção de anticorpos IgE. Isto sugere que a utilização periódica de vacinas associadas a componentes de alumínio pode estar relacionada ao aumento da incidência de doenças alérgicas. (KISHIMOTO & ISHIZAKA, 1973; COGNÉ, 1986).

Analisando os resultados obtidos, podemos considerar a possibilidade que os adjuvantes que induziram um infiltrado predominantemente macrofágico até as 72 horas de observação (SEPPIC-I, SEPPIC-II e Avridine) são mais eficientes em induzir uma resposta humoral, uma vez que, os macrófagos são as células que vão processar o antígeno e apresentar epítopos aos linfócitos, principais células na imunidade adquirida (Tabela 1; Fig. 4). Segundo PASSOLD (2001), o adjuvante Avridine mostrou maior capacidade de estimulação dos níveis de anticorpos anti-rábicos e os adjuvantes Avridine e SEPPIC-I demonstraram maior capacidade de indução de resposta imune humoral secundária contra o vírus.

Outros estudos têm demonstrado, por exemplo, um significativo aumento na resposta imune e proteção induzidos pela vacina anti-aftosa (FMDV) acrescida do adjuvante Avridine. Este adjuvante é capaz de induzir uma resposta imune duradoura relacionada a uma eficiente atividade das células apresentadoras de antígeno (APC). APC de animais imunizados com vacinas contendo avridine induziram aumento na concentração de anticorpos neutralizantes. A indução de APC foi considerada como fator crítico no processo de aumento de imunogenicidade em vacina experimental contra FMDV (WIGDOROVITZ, 1998).

O adjuvante SEPPIC MONTANIDE ISA 720 é muito utilizado em vacina recombinante contra Malária, obtendo como resultado, aumento nos níveis de anticorpos em camundongos, coelhos e ovelhas. Este adjuvante também tem se mostrado promissor no desenvolvimento de uma resposta imune por linfócitos T (LAWRENCE, 1997). Os adjuvantes SEPPIC-I e SEPPIC-II não induziram este tipo de resposta neste estudo (Fig. 6;

Fig. 9). A injeção do adjuvante SEPPIC MONTANIDE ISA 720 associado à vacina anti-malária têm mostrado diminuição do desconforto, dor, edema local e aparentemente não deixa sequelas (LAWRENCE, 1997), este dado pode ser associado ao pequeno número de neutrófilos observado em nossos resultados, significando então a pouca indução inflamatória do adjuvante SEPPIC e menor lesão tecidual induzida no sítio inflamatório. (Fig. 3).

Os adjuvantes que induzem infiltrado neutrofílico (Algamulin, Hidróxido de Alumínio e Beta-Glucana 2 e 4mg – Tabela 1), que são as células que chegam primeiro ao sítio inflamatório, podem induzir uma resposta humoral reduzida pelo fato de os neutrófilos poderem destruir os antígenos e impedirem assim, que os macrófagos, ao chegarem no foco inflamatório, entrem em contato com o antígeno e os apresentem aos linfócitos. Porém, estudos de degradação antigênica não foram realizados uma vez que não faziam parte do objetivo deste estudo.

Deve-se mencionar que o infiltrado neutrofílico induzido pelos adjuvantes citados acima não diferem estatisticamente dos valores obtidos no grupo controle (Fig. 3). Este dado de certa forma corrobora a interpretação acima de que o infiltrado neutrofílico inicial pode induzir uma certa rápida destruição do antígeno. Isso explicaria a baixa capacidade de indução de resposta imune humoral nos grupos experimentais e controle, acima descritos. Porém, com o adjuvante Avridine obteve-se um aumento significativo no número de neutrófilos após 24 horas (Fig. 3). Desta forma, a possibilidade de baixa capacidade imunogênica não pode ser explicada unicamente pela hipótese acima apresentada.

O processo inflamatório é essencial para aumentar o número de fagócitos, aumentando assim as chances de eliminação dos agentes indutores da inflamação, entretanto a produção e liberação de enzimas degradativas e espécies reativas de oxigênio, particularmente pelos neutrófilos e macrófagos ativados podem difundir-se para fora da célula permitindo o ataque a patógenos, mas também podem causar extensa lesão tecidual durante o curso de uma infecção.

Pode-se, então, considerar o fato que a presença de um infiltrado neutrofílico estaria associado a uma lesão epidérmica e dérmica mais importante, sem, contudo, induzir uma resposta imune específica eficiente. Clinicamente, podemos esperar a presença de úlceras

e/ou lesões cutâneas inflamatórias caso os adjuvantes que induzem infiltrado neutrofilico sejam utilizados.

Os mesmos mecanismos usados pelo organismo para proteção contra infecções podem, em situações particulares, serem causadores de doenças. O que determina a passagem de uma condição para a outra não é bem conhecido, e os limites são bastante tênues (JANCAR, 2001).

Quando observamos a indução de resposta imune adaptativa, os resultados mostram que apenas o adjuvante Avridine induziu uma migração linfocitária importante após 24 horas de observação e que esta população linfocitária é compreendida pelas subpopulações T CD4⁺ (auxiliar) e T CD8⁺ (citotóxico), resultados estes que foram estatisticamente significativos. (Fig. 6; Fig. 9). Além de sua função citotóxica, as células T CD8 também secretam citocinas, que podem influenciar a resposta imune. São células que agem predominantemente na resposta imune adaptativa objetivando ação citolítica em células apresentando antígenos intracelulares estranhos ao hospedeiro. (MALEK, 2002).

A presença efetiva de linfócitos T CD4⁺ é crucial, pois são estas células que vão liberar várias citocinas que ativam macrófagos aumentando a capacidade microbicida, de apresentação de antígenos destas células (IFN- γ e IL-12) e produção de citocinas que irão aumentar a resposta inflamatória e podem induzir melhor capacidade de produção e liberação de anticorpos pelos linfócitos B CD19⁺ (IL-10, IL-4, IL-5 e IL-13). Altos níveis de IFN- γ foram observados em grupos de camundongos vacinados e tratados com Avridine (MEGID *et al.*, 1999). A utilização de indutores de interferon associados à vacina anti-rábica foi anteriormente descrita. Estudos evidenciaram que vacina anti-rábica associada a Avridine, em bovinos, induz uma resposta mais persistente e de altos níveis de anticorpos primários do que vacinas associadas a Hidróxido de Alumínio (MEGID *et al.*, 1999).

A resposta imune induzida por vacina anti-rábica, incluindo reação de hipersensibilidade tardia (DTH), produção de IFN-gama, e IL-2 por linfócitos T auxiliares e T citotóxicos, vem sendo estudada. As respostas imunes humoral e celular induzidas pela vacinação anti-rábica são consideradas importantes mecanismos de proteção contra o vírus rábico. O adjuvante Avridine induz um aumento na atividade de linfócitos nos linfonodos locais (MEGID *et al.*, 1999).

Com relação aos efeitos da Beta Glucana observamos uma dicotomia de resposta conforme a dose utilizada. Doses de 2 mg induziram mais alteração em células da imunidade inespecífica (Tabela 1). Este fato já havia sido demonstrado em estudos que observaram o fato que Beta Glucana age como um estimulante não específico do sistema imune (CROSS, 2001). Este adjuvante interage com receptores, que são identificados como receptores de componentes da via do complemento, específicos em monócitos e neutrófilos humanos. Estudos mostram que Beta Glucana ativa efetivamente macrófagos e neutrófilos resultando no aumento de citocinas como, IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF e fatores estimuladores de colônia como, GM-CSF. Ao contrário da maioria dos adjuvantes a base de óleo ou detergente, Beta Glucana em base salina não causa efeitos locais como, a formação de granulomas no local da injeção, e a efetividade na estimulação de títulos de anticorpos está bem estabelecida em uma variedade de espécies animais. Esta combinação de eficácia e segurança do Beta Glucana proporciona a busca de sua utilização como adjuvante e como veículo entregador de drogas para uso humano e veterinário (OSTROFF, 1991).

Em aparente contradição, neste estudo observam-se diferenças na mobilização celular entre as duas concentrações do produto, sem uma explicação satisfatória para a observação (Tabela 1). Como já mencionado, a atividade de Beta-Glucana consiste na ligação a β -receptores específicos e ativação da cascata de respostas imunológicas que promovem a produção de títulos mais elevados de anticorpos séricos para antígenos específicos (CZOP & AUSTEN, 1985). Preferencialmente induz altos títulos de anticorpos e reduz a resposta citotóxica (HARRIS, 1996). Potencializa resposta celular e humoral a um grupo diverso de antígenos tumorais, conferindo também resistência não específica a doenças neoplásicas, bacterianas e fúngicas. Beta Glucana de origem fúngica tem sido descrita como candidata promissora para prevenção ou terapia de lepra experimental (DELVILLE & JACQUES, 1980), candidíase (WILLIAMS *et al.*, 1978), leishmaniose (COOK *et al.*, 1980), malária (GILLET *et al.*, 1978), toxoplasmose (NGUYEN & STADTSBAEDER, 1980) e inúmeras outras doenças. Nenhum anticorpo é produzido contra Beta Glucana. Quando co-administrada com soro albumina bovina aumenta em 1000 vezes os títulos de anticorpos em ratos em comparação com o antígeno sozinho. Beta Glucana estimula títulos de anticorpos equivalentes ao Adjuvante Completo de Freund sem a toxicidade e

histopatologia associadas ao seu uso. Estudos sugerem que o uso deste adjuvante, seguro, poderá inovar as vacinas de nova geração (OSTROFF, 1991).

O adjuvante Algamulin induz uma resposta fagocítica importante no infiltrado induzido na bolsa de ar subcutânea (Tabela 1). Algamulin (γ -inulina + alumínio) é um equivalente do Hidróxido de Alumínio, embora seu mecanismo de ação seja diferente (LESLIE, 1990). Sua principal propriedade é o aumento da resposta imunológica pela ligação dos antígenos aos receptores do complemento na superfície dos leucócitos. Algamulin é um potente indutor de imunidade humoral e celular (COOPER & STEELE, 1988; DOEL *et al.*, 1995), capaz de ativar a via alternativa do complemento (COOPER & STEELE, 1988). Entretanto outras observações sugerem que Algamulin favorece resposta tipo Th2 (HARRIS, 1996). Algamulin inoculado via intra peritonal em camundongos ocasiona preferencialmente resposta humoral, enquanto por via subcutânea ocasiona preferencialmente um aumento da resposta mediada por células através das vias Th1 e Th2 (COOPER, 1994). Esta observação pode explicar a variação nos perfis celulares de linfócitos T e B observados neste estudo (Tabela 2).

Quando observado o comportamento da população de linfócitos B CD19+, notou-se que o número destas células diminuiu no interior da bolsa de ar dos camundongos desafiados com Avridine após 24 horas. (Fig. 12) Os demais adjuvantes não demonstraram resultados significativos. RWEYEMAMU (1986), demonstrou que Avridine apresenta como propriedades principais o aumento da resposta linfoproliferativa, aumento de IgG1 e IgG2 (resposta humoral) e aumento de resposta celular. Em termos gerais, aumenta o nível e a duração da resposta imune. A utilização de Avridine tem mostrado um aumento na resposta de IgA de mucosa, após a aplicação intrainestinal ou parenteral associado a toxina colérica em camundongos (REHMANI & SPRADBROW, 1995). Desta forma, podemos considerar a hipótese que a ausência de linfócitos B induzidos por este adjuvante pode ser causada pela alta capacidade de transformação blástica destas células em plasmócitos (secretoras de anticorpos). Esta última, por sua vez, não expressa CD19+, tende a predominar no linfonodo de drenagem e medula óssea dos animais desafiados com um determinado antígeno indutor de resposta humoral.

Este estudo demonstra, então, que há diferença na capacidade de indução do infiltrado inflamatório entre os diferentes adjuvantes utilizados. Estas diferenças podem resultar em

padrões de resposta imune diferentes, de acordo com a célula mais estimulada. Assim, adjuvantes indutores de migração predominantemente mononuclear parecem facilitar respostas do padrão celular. Por outro lado, respostas mais neutrofílicas podem resultar em maiores efeitos colaterais locais e/ou sistêmicos associados à redução da disponibilidade antigênica para o sistema imune. Apesar das limitações do nosso estudo, os resultados são consistentes com esta hipótese. Futuras investigações poderão ser realizadas na busca da comprovação destas associações, porém especificamente neste estudo, a confirmação desta relação não era o objeto.

9. Conclusões

Os resultados obtidos nos permitem as seguintes conclusões:

1. Todos os adjuvantes induzem inflamação cutânea;
2. Existe diferença de intensidade e na qualidade do infiltrado inflamatório induzido entre os diferentes adjuvantes utilizados.
 - a. Alguns adjuvantes induzem um infiltrado inflamatório predominantemente de células mononucleares;
 - b. Outros de células polimorfonucleares;
3. As diferenças acima mencionadas parecem resultar em padrões de resposta imune diferentes, de acordo com a população celular mais estimulada;
 - a. Os padrões de resposta predominantemente mononuclear foram observados com SEPPIC-I e SEPPIC-II;
 - b. O Padrão de resposta apresentando grande quantidade de células polimorfonucleares foi observado com Hidróxido de Alumínio, Algamulin e Beta Glucana;
 - c. Avridine apresentou um infiltrado misto no qual havia a presença tanto de células mononucleares quanto polimorfonucleares;

10. Bibliografia

- AFONSO, L. C.; SCHARTON, T. M. *et al.* - The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. **Science**, v.263, n.5144, p. 235-7, 1994.
- AMADOR, R., MORENO, A., VALERO, V. *et al.* - The first field trials of the chemically synthesized malaria vaccine Spf66: safety, immunogenicity and protectivity. **Vaccine** **10**: 179-184, 1992.
- ANDERSON, A.O. & REYNOLDS, J.A. - Adjuvant effects of the lipid amine CP-20,961. **Reticuloendothelial Soc.** **26**: 667-680, 1979.
- ANDERSON, G. - Resolution of chronic inflammation by therapeutic induction of apoptosis. **Trends Pharmacol Sci** , v.17, p. 438-442, 1996.
- AUCOUTURIER, J., DEVILLE, S., PERRET, C. *et al.* - Assessment of efficacy and safety of various adjuvant formulations with a total soluble extract of *Trichinella spiralis*. **Parasite** **8** (2): 126-32, 2001.
- AUCOUTURIER, J., DUPUIS, L. & GANNE, V. - Adjuvants designed for veterinary and human Vaccines. **Vaccine** **19** :17-19, 2001.
- AUDIBERT, F.M. & LISE, L.D. - Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. **Imunol. Today** **14**: 281-284, 1993.
- BACELLAR, O., C. BRODSKYN *et al.* - Interleukin-12 restores interferon-gamma production e cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases** **173**(6): 1515-8, 1996.
- BAGGIOLINI, M. & LOETSCHER, P. – Chemokines in Inflammation and Immunity. **Immunology Today** **21**(8):418-420, 2000.
- BARNES, P. J. & ADCOCK, I. - Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends in Pharmacological Sciences** **14**(12): 436-41, 1993.
- BARNES, P. J., KARIN, M. Nuclear factor kappa-B—a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N Engl J Med** **336**:1066–1071, 1997.
- BERG, D. J., LEACH, M. W. *et al.* - Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses. **J Exp Med** **182**(1): 99-108, 1995.
- BERNARDES, F. C. - **Análise da reação inflamatória peritonial e subcutânea induzida pela infecção experimental de camundongos por *Leishmania major*.**

- Florianópolis, 2000. [Monografia Conclusão de Curso – Universidade Federal de Santa Catarina]
- BEVERLEY, P.C.L. - Vaccine immunity. **Immunology Today** **18**(9): 413-415, 1997.
 - BINGAMAN, A. W., HA, J. *et al.* - Vigorous allograft rejection in the absence of danger. **J Immunol** **164**(6): 3065-71, 2000.
 - BLEEKER, W. K., DE_GROOT, E. M. *et al.* - Measurement of interleukin-6 production by monocytes for in vitro safety testing of hemoglobin solutions. **Artificial Cells, Blood Substitutes, e Immobilization Biotechnology** **22**(3): 835-40, 1994.
 - BONACHO, M.G., CARDINALI, D.P., CASTRILLÓN, P. – Aging-induced in 24-h rhythms of mitogenic responses, lymphocyte subset populations and neurotransmitter and amino acid content in rat submaxillary lymph nodes during Freund's adjuvant arthritis. **Experimental Gerontology** **36**: 267-282, 2001.
 - BONE, R. C. - Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). **Ann Intern Med** **125**(8): 680-7, 1996.
 - BONE, R. C. - Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. **Crit Care Med** **24**(7):1125-8, 1996.
 - BOROS, D. L. The role of cytokines in the formation of the schistosome egg granuloma. **Immunobiol** **191**:441–450, 1994.
 - BRODSKY, C., BEVERLEY, S. M. *et al.* - Virulent or avirulent (dhfr-ts-) *Leishmania major* elicit predominantly a type-1 cytokine response by human cells in vitro. **Clinical e Experimental Immunology** **119**(2): 299-304, 2000.
 - BRUN, J.G., HALAND, G., HAGA, H. J. *et al.* - Effects of calprotectin in avridine-induced arthritis. **APMIS** **103**(3) :233-40, 1995.
 - BUCKLEY, T. L., BRAIN, S. D. *et al.* - Inflammatory edema induced by interactions between IL-1 and the neuropeptide calcitonin gene-related peptide. **J Immunol** **146**(10): 3424-30, 1991.
 - CELDRAN, A., INARREA, P. *et al.* - Neutrophil dynamics in abdominal cavity of peritonitic rats treated with antiseptics. **Int Surg** **78**(4): 354-6, 1993.
 - CHEN, X. & CHRISTOU, N. V. - Relative contribution of endothelial cell e polymorphonuclear neutrophil activation in their interactions in systemic

- inflammatory response syndrome. **Arch Surg** **131**(11): 1148-53; discussion 1153-4, 1996.
- CHENSUE, S.W , WARMINGTON, K.S., RUTH, J.H. *et al.* Cytokine function during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation. Local and regional participation of IFN-gamma, IL-10, and TNF. **J Immunol** **154**:5969–5976, 1995.
- CHIN, J. & GIL, F. S. - Skin delivery of hybrid liposome/ISCOM vaccine implicates a role for adjuvants in rapid modulation of inflammatory cells involved in innate immunity before the enhancement of adaptative immune responses. **Immunology and Cell Biology**, Camden, Sydney, New South Wales, Australia, 1998. p. 245-255.
- CHROUSOS, G. P. - The hypothalamic-pituitary-adrenal axis e immune-mediated inflammation. **New England Journal of Medicine** **332**(20): 1351-62, 1995.
- COGNÉ, M., BALLEET, J.J. *et al.* - B.Total and IgE antibody levels following booster immunization with aluminium adsorbed and non-adsorbed tetanus toxoid in humans. **Ann. Allergy**, 148-151, 1986.
- COHEN, S. - Cell mediated immunity and the inflammatory system. **Hum Pathol** **7**(3): 249-64, 1976.
- COOK, J.A., HOLBROOK, T. W. & PARKER B. W. - Visceral leishmaniasis in mice: protective effect of glucan. **J. Reticuloendothel. Soc.** **27**, 567-573, 1980.
- COOPER, P.D., - The selective induction of different immune responses by vaccine adjuvants. In: _____ **Strategies in vaccine design** (Ed. Ada, G.L.) R.G. Landes Company, Austin, 1994. pp. 125-158.
- COOPER, P.D., ed. - **Vaccine Design, Pharmaceutical Biotechnology Series** , ed. Plenum Publishing Corp, New York, 1994.
- COOPER, P.D., ed. - **The subunit and adjuvant approach** , editora Plenum, New York, 1995. p. 565.
- COOPER, P.D., McCOMB, C. & STEELE, E.J. - The adjuvanticity of Algamulin, anew vaccine adjuvant. **Vaccine** **9**: 408-433, 1991.
- COOPER, P.D. & STEELE, E.J. - The adjuvanticity of gamma inulin. **Immunol. Cell. Biol.** **66**: 345-352, 1988.
- COLEMAN, P.C., SHAW, F.E., SEROVICH, J. *et al.* - Intradermal hepatitis B vaccination in a large hospital employee population. **Vaccine** **9**: 723-727, 1991.

- CROSS, G.G., JENNINGS, H.J., WHITFIELD, D.M. *et al.* - Immunostimulant oxidized beta-glucan conjugates. **Int Immunopharmacol** **1**(3) :539-50, 2001.
- CZOP J.K., AUSTEN K.F. *J. Immunol*, p134, 2588, 1985.
- CZOP J. K., AUSTEN K. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, p82, 2751, 1985.
- CUNHA, F. Q., POOLE, S. *et al.* - The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol** **107**(3): 660-4, 1992.
- DAVIES, M. G., FULTON, G. J., HAGEN, P. O. Clinical biology of nitric oxide. **Br J Surg** **82**:1598–1610, 1995.
- DE BRITO, F. B., MOORE, A. R. *et al.* - Adjuvant polyarthritis e the response of air pouch lining cells. **Int J Tissue React** **8**(4): 289-94, 1986.
- DELICONSTANTINOS, G., VILLIOTOU, V. *et al.* - Nitric oxide e peroxynitrite released by ultraviolet B-irradiated human endothelial cells are possibly involved in skin erythema e inflammation. **Exp Physiol** **81**(6): 1021-33, 1996.
- DELVES, P. J. & ROITT, I. M. - The immune system. First of two parts. **N Engl J Med** **343**(1): 37-49, 2000.
- DELVES, P. J. & ROITT, I. M., - The immune system. Second of two parts. **N Engl J Med** **343**(2): 108-17, 2000.
- DELVILLE J. & JACQUES P. J., - Therapeutic and prophylactic effects of yeast glucan and related polysaccharidic immunomodulators in experimental leprosy. **Int. J. Immunopharmac.** p.183, 1980.
- DENIS, M. Human monocytes/macrophages: NO or no NO? **J Leukoc Biol** **55**:682–684, 1994.
- DE SOUZA, R. C. A. - **Estudo da cinética celular da resposta inflamatória causada pela crioterapia experimental em pele normal de camundongos utilizando o método de bolsas de ar no subcutâneo.** Florianópolis, 2001. [Tese Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina]
- DIEU-NOSJEAN, M. C., MASSACRIER, C. *et al.* - Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. **J Exp Med** **192**(5): 705-18, 2000.

- DILLON, S.B., DEMUTH, S.G., SCHNEIDER, M.A. *et al.* - Induction of protective MHC-restricted CTL in mice by a recombinant influenza vaccine in aluminium hydroxide adjuvant. **Vaccine** **10**: 309-318, 1992.
- DINARELLO, C. A. - The biological properties of interleukin-1. **Eur Cytokine Netw** **5**(6): 517-31, 1994.
- DOEL, H.S., PALMER, D.G., DUNSMORE, T. & CARNEGIE, P.R. - The influence of gamma inulin and Algamulin on the immune response in sheep to e recombinant antigen of *Taenia ovis*. **Vaccine** **13**: 429-433, 1995.
- DUMONDE, D. C., PULLEY, M. S. *et al.* - Histological features of skin reactions to human lymphoid cell line lymphokine in patients with advanced cancer. **J Pathol** **138**(4): 289-308, 1982.
- DUNN, C. J., HARDEE, M. M. *et al.* - Acute and chronic inflammatory responses to local administration of recombinant IL-1 alpha, IL-beta, TNF alpha, IL-2 and IFN gamma in mice. **Agents Actions** **27**(3-4): 290-3, 1989.
- DURHAN, S. R. - Allergic inflammation. **Pediatr Allergy Immunol** **4**(4 Suppl):7-12, 1993.
- EDELMAN, R. - Vaccine Adjuvants – **Rev. Infect. Dis.** **2**: 370-383, 1980.
- EDWARDS, J. C., SEDGWICK, A. D. *et al.* - The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. **J Pathol** **134**(2): 147-56, 1981.
- EDWARDS, S. W. & WATSON, F. - The cell biology of phagocytes. **Immunology Today** **16**(11): 508-510, 1995.
- EGAN, P. J., KIMPTON, W. *et al.* - Inflammation-induced changes in the phenotype and cytokine profile of cells migrating through skin e afferent lymph. **Immunology** **89**(4): 539-46, 1996.
- ESSER, M. T., MARCHESE, R. D., KIERSTEAD, L.S. *et al.* - Memory T cells and vaccines. **Vaccine** **21**: 419–430, 2003.
- FOLLIN, P. Skin chamber technique for study of in vivo exudated human neutrophils. **J Immunol Methods** **232**(1-2): 55-65, 1999.
- GALLIN, J., GOLDSTEIN, I. *et al.*, eds. - **Inflammation**. New York, Raven Press, 1992.

- GEISER, D. R. & WALKER, R. D. - Management of thermal injuries in large animals. **Vet Clin North Am [Large Anim Pract]** 6(1): 91-105, 1984.
- GILLET J., JACQUES P. J. & HERMAN F., eds. - **Advances in Experimental Medicine and Biology**. Plenum Press, New York, 1978. p. 307-313.
- GOLDING, B. - Cytokine regulation of humoral immune responses. In: - **Topics in vaccine adjuvant research**. Springs, D.R & Koff, W.C. (Eds). CRC Press, Boca Raton, FL, 1991. pp. 25-37.
- GOLDSTEIN, I. M. Complement: biologically active products. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. - **Inflammation**. 2nd ed. New York, Raven Press, 1992. P.63–80.
- GOTO, N. KATO, H., MAEYAMA, J. *et al* -Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. **Vaccine** 11 (9): 914-918, 1993
- GUPTA R. K., RELYVELD E. H., LINDBLAD E. B., et al. - Adjuvants – a Balance Between Toxicity and Adjuvanticity. **Vaccine** 11 (293), 1993.
- GUPTA, R. K., SIBER, G. R. - Adjuvants for Human Vaccines – Current Status, Problem and Future Prospects. **Vaccine** 13 (14): 1263-1276, 1995.
- HAMBLETON, P. & MILLER, P. - Studies on immunological air pouch inflammation in the rat. **Int Arch Allergy Appl Immunol** 87(1): 70-5, 1988.
- HARRIS, S.J., GEARING, A.J.H., LAYTON, G.T. *et al*. - Enhanced proliferative cellular responses to HIV-1 V3 peptide and gp 120 following immunization with V3:Ty virus-like particles. **Immunology** 77: 315-321, 1992.
- HARRIS, S. J., WOODROW, S. A., GEARING, A. J. H. *et al*. – The effects of adjuvants on CTL induction by V3:TY-virus-like particles (V3-VLPs) in mice. **Vaccine** 14(10): 971-976, 1996.
- HART M. K., PALKER T. J., MATHEWS T. J. *et al*. - Synthetic peptides containing T and B cell epitopes from human immunodeficiency virus envelope gp120 induce anti-HIV proliferative responses and high titres of neutralizing antibodies in rhesus monkeys. **J. Immunol**, 145-2677, 1990.
- HAWKINS, D. L., MACKAY, R. J. *et al*. - Effects of intra-articularly administered endotoxin on clinical signs of disease and synovial fluid tumor necrosis factor,

- interleukin 6, e prostaglandin E2 values in horses. **Am J Vet Res** **54**(3): 379-86, 1993.
- HENRIQUES, M. G., SILVA, P. M. *et al.* - Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Braz J Med Biol Res** **20**(2): 243-9, 1987.
- HIRASAWA, N., WATANABE, M. *et al.* - Induction of neutrophil infiltration by rat chemotactic cytokine (CINC) e its inhibition by dexamethasone in rats. **Inflammation** **16**(2): 187-96, 1992.
- HOFFMAN, W.W., KORST, J.J., NIBLACK, J.F. *et al.* - N,N-dioctadecyl-N',N'-bis(2-hydroxyethyl)propanediamine: antiviral activity and interferon stimulation in mice. - **Antimicrob. Agents Chemother** **3**: 498-502, 1973.
- HOLADAY, B. J., SADICK, M. D. *et al.* - Reconstitution of *Leishmania* immunity in severe combined immunodeficient mice using Th1- e Th2-like cell lines. **Journal of Immunology** **147**(5): 1653-8, 1991.
- HOLERS, V. M. Complement. In: Rich RR, Fleisher TA, Schwartz BD Shearer WT, Strober W, eds. - **Clinical immunology: principles and practice**. St. Louis, Mosby–Year Book, 1996, p.363–391.
- HOUCK, J. C., HELLMAN, K. B. *et al.* - The biochemistry of lymphocyte-derived mediators of immunological inflammation. **Agents Actions** **8**(1-2): 73-9, 1978.
- HUTTER, C. & POULTER, L. W. - The balance of macrophage subsets may be customised at mucosal surfaces. **FEMS Microbiol Immunol** **5**(5-6): 309-15, 1992.
- IIDA, M., WATANABE, K. *et al.* - Level of neutrophil chemotactic factor CINC/gro, a member of the interleukin-8 family, associated with lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. **Infect Immun** **60**(4): 1268-72, 1992.
- ISHIDA, H., FUJII, E. *et al.* - Role of inflammatory mediators in lipid A analogue (ONO-4007)-induced vascular permeability change in mouse skin. **Br J Pharmacol** **130**(6): 1235-40, 2000.
- JACKSON, J. R., BOLOGNESE, B. *et al.* - The role of platelet activating factor e other lipid mediators in inflammatory angiogenesis. **Biochim Biophys Acta** **1392**(1): 145-52, 1998.

- JAKOB, T. & UDEY, M. C. - Regulation of E-cadherin-mediated adhesion in Langerhans cell-like dendritic cells by inflammatory mediators that mobilize Langerhans cells in vivo. **J Immunol** **160**(8): 4067-73, 1998.
- JANCAR, S. - Imunidade natural e inflamação. In: - **Imunologia**. CALISH, V. & VAZ, C. (Eds). Editora Revinter, Rio de Janeiro, 2001. p.11-29.
- JANOFF, A., SCHAEFER, S. *et al.* - Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. II. Mechanism of action of lysosomal cationic protein upon vascular permeability in the rat. **J Exp Med** **122**(5): 841-51, 1965.
- KAEBERLE M. L., - Function of Carriers and Adjuvants in induction of immune Responses. In: _____ - **Advances in Carries and Adjuvants for Veterinary Biologics**. University press, 1986. p12.
- KAPP, A. - The role of cytokines in the psoriatic inflammation. **J Dermatol Sci** **5**(3): 133-42, 1993.
- KILLICK-KENDRICK, R. - The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. [Review]. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee** **1**: 37-42, 1990.
- KIM, S.K., RAGUPATHI, G., MUSSELLI, C. *et al.* - Comparison of the effect of different immunological adjuvants on the antibody and T-cell response to immunization with MUC1-KLH and GD3-KLH conjugate cancer vaccines. **Vaccine** **18**: 297-603, 2000.
- KIMA, S. K., RAGUPATHIA, G., MUSSELLI, C. *et al.* - Comparison of the effect of different immunological adjuvants on the antibody and T-cell response to immunization with MUC1-KLH and GD3-KLH conjugate cancer vaccines. **Vaccine** **18**: 597-603, 2000.
- KISHIMOTO T., ISHIZAKA K. - Regulation of antibody response in vitro. VI. Carrier-specific helper cells for IgG and IgE antibody response. **J. Immunol**, 720-732, 1973.
- KLEIN, R. D., SU, G. L. *et al.* - Skin lipopolysaccharide-binding protein e IL-1beta production after thermal injury [In Process Citation]. **J Burn Care Rehabil** **21**(4): 345-52, 2000.

- KONDO, S. & SAUDER, D. N. - Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1 (p55) is a main mediator for TNF-alpha-induced skin inflammation. **Eur J Immunol** **27**(7): 1713-8, 1997.
- KOZEL, T. R. Activation of the complement system by pathogenic fungi. **Clin Microbiol Rev** **9**:34-46, 1996.
- KUHNS, D. B., DE CARLO, E. *et al.* - Dynamics of the cellular e humoral components of the inflammatory response elicited in skin blisters in humans. **J Clin Invest** **89**(6): 1734-40, 1992.
- KUNKEL, S. L, LUKACS, N.W., STRIETER, R. M., & CHENSUE, S.W. Th1 and Th2 responses regulate experimental lung granuloma development. **Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis** **13**:120-128, 1996.
- KUPPER, T. S., CHUA, A. O. *et al.* - Interleukin 1 gene expression in cultured human keratinocytes is augmented by ultraviolet irradiation. **J Clin Invest** **80**(2): 430-6, 1987.
- KURIHARA, A., OHUCHI, K. *et al.* - Correlation of leukocyte accumulation with chemotactic activity in the exudate of an allergic air-pouch inflammation. **Int Arch Allergy_Appl Immunol** **71**(4): 368-70, 1983.
- LAINSON, R., RYAN, L. *et al.* - Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector e some observations on the mechanism of transmission. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz** **82**(3): 421-4, 1987.
- LAUNOIS, P., LOUIS, J. A. *et al.* - The fate e persistence of *Leishmania major* in mice of different genetic backgrounds: an example of exploitation of the immune system by intracellular parasites. **Parasitology** **115** Suppl: S25-32, 1997.
- LAWLEY, T. J. & KUBOTA, Y. - Cell adhesion molecules e cutaneous inflammation. **Semin Dermatol** **10**(3): 256-9, 1991.
- LAWRENCE, G. W., SAUL, A., GIDDY, A. J. *et al.* - Phase I trial in humans of an oil-based adjuvant SEPPIC MONTANIDE ISA 720. **Vaccine** **15**(2):176-178, 1997.
- LEIBY, D. A., SCHREIBER, R. D. *et al.* - IFN-gamma produced in vivo during the first two days is critical for resolution of murine *Leishmania major* infections. **Microbial Pathogenesis** **14**(6): 495-500, 1993.

- LESLIE, D.E., NICHOLSON, S., DIMITRAKAKIS, M. *et al.* - Humoral immune responses in mice using gamma inulin preparations as adjuvants for hepatitis B vaccines. **Immunol Cell Biol** **68**(2):107-12, 1990.
- LISTON, S. L. - Nonbacterial inflammation as a means of enhancing skin flap survival. **Laryngoscope** **94**(8): 1075-85, 1984.
- LORENTZEN, J. C., GLASER, A., JACOBSSON, L. *et al.* - Identification of rat susceptibility loci for adjuvant-oil induced arthritis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **95**: 6383–6387, 1998.
- LUSTER, A. D. - Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N Engl J Med** **338** (7):436-45, 1998.
- MAGGI, E. - The TH1:TH2 paradigm in allergy. **Immunotechnology** **3**: 233–244, 1998.
- MARSHALL, J. S. & BIENENSTOCK, J. - The role of mast cells in inflammatory reactions of the airways, skin and intestine. **Curr Opin Immunol** **6**(6): 853-9, 1994.
- McINERNEY, T. L., BRENNAN, F. R., JONES, T. D. *et al.* - Analysis of the ability of five adjuvants to enhance immune responses to a chimeric plant virus displaying an HIV-1 peptide. **Vaccine** **17**: 1359-1368, 1999.
- MEGID, J., PERAÇOLLI, M.T.S., CURI, P.R. *et al.* - Effect of the bacillus of Calmette-Guérin, Propionibacterium acnes and avridine as immunomodulators in antirabies vaccination of mice using the Fuenzalida-Palacios mouse brain vaccine. **Vaccine** **17** 2446-2452, 1999.
- MIBU, Y., SHIMOKAWAY, Y. *et al.* - Lymphocyte chemotaxis in inflammation X. heterogeneity of chemotactic responsiveness in human T subsets towards lymphocyte chemotactic factors from delayed hypersensitivity reaction site. **Immunology** **55**(3): 473-9, 1985.
- MILLER, A. J., HOPKINS, S. J. *et al.* - Sites of action of IL-1 in the development of fever e cytokine responses to tissue inflammation in the rat. **Br J Pharmacol** **120**(7): 1274-9, 1997.
- MOCCI, S. & COFFMAN, R. L. - Induction of a th2 population from a polarized *Leishmania*-specific th1 population by in vitro culture with il-4. **Journal of Immunology** **154**(8): 3779-3787, (1995).

- MOON, D. K. & GECZY, C. L. - Recombinant IFN-gamma synergizes with lipopolysaccharide to induce macrophage membrane procoagulants. **Journal of Immunology** **141**(5): 1536-42, 1988.
- MORNEX, J. F., LEROUX, C., GREENLAND, T. & ECOCHARD, D. From granuloma to fibrosis in interstitial lung diseases: molecular and cellular interactions. **Eur Respir J** **7**:779–785, 1994.
- MOSMAN T.R., COFFMAN R. L. - Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. **Adv Immunol**, 46 – 47, 1989.
- MOVAT, H. Z., BURROWES, C. E. *et al.* - Acute inflammation and a Shwartzman-like reaction induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor. Synergistic action of the cytokines in the induction of inflammation and microvascular injury [published erratum appears in *Am J Pathol* 1988 Mar;130(3):642]. **Am J Pathol** **129**(3): 463-76, 1987.
- MOVAT, H. Z., CYBULSKY, M. I. *et al.* - Acute inflammation in gram-negative infection: endotoxin, interleukin 1, tumor necrosis factor, e neutrophils. **Fed Proc** **46**(1): 97-104, 1987.
- MULLER-EBERHARD, H. J. - Complement: chemistry and pathways. In: **Inflammation**. Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, (eds.), 2nd ed. New York, Raven Press, 1992, p.33–62.
- MUNDER, P.G., FEBER, E., MODOLELL, M. & FISCHER, H. - The influence of various adjuvants on the metabolism of phospholipids in macrophages. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.** **36**: 117-128, 1969.
- NAIK, S. M., CANNON, G. *et al.* - Human keratinocytes constitutively express interleukin-18 e secrete biologically active interleukin-18 after treatment with pro-inflammatory mediators e dinitrochlorobenzene. **J Invest Dermatol** **113**(5): 766-72, 1999.
- NAIM, J. O., VAN OSS, C. J., WU, W. *et al.* – Mechanism of adjuvancy: I-metal Oxides as adjuvants. **Vaccine** **15**(11): 1183-1193, 1997.
- NGUYEN B. T. & STADTSBAEDER S., ed. - **Comparative biological and antitoxoplasmic effects on particulate and water soluble polysaccharides, in vitro**. Plenum Press, New York, 1980. pp.255-268.

- NUNBERG, J.H., DOYLE, M.V., YORK, S.M. *et al.* - Interleukin 2 acts as an adjuvant to increase the potency of inactivated rabies virus vaccine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **86**: 4240-4243, 1989.
- ODA, T. & KATORI, M. - Inhibition site of dexamethasone on extravasation of polymorphonuclear leukocytes in the hamster cheek pouch microcirculation. **Journal of Leukocyte Biology** **52**(3): 337-42, 1992.
- OGARRA, A. & MURPHY, K. - Role of cytokines in determining t-lymphocyte function. **Current Opinion in Immunology** **6**(3): 458-466, 1994.
- OHZATO, H., MONDEN, M. *et al.* - Systemic production of interleukin-6 following acute inflammation. **Biochem Biophys Res Commun** **197**(3): 1556-62, 1993.
- OMATA, M., WATANABE, M. *et al.* - A role of peripheral leukocytes in vascular permeability and edema formation in air pouch type allergic inflammation in rats. **J Pharmacobiodyn** **14**(5): 267-75, 1991.
- ORTEU, C. H., POULTER, L. W. *et al.* - The role of apoptosis in the resolution of T cell-mediated cutaneous inflammation. **J Immunol** **161**(4): 1619-29, 1998.
- ORTIZ-BRAVO, E. & SCHUMACHER, H. R. Jr. - Components generated locally as well as serum alter the phlogistic effect of monosodium urate crystals in vivo. **J Rheumatol** **20**(7): 1162-6, 1993.
- ORMSTAD, H., GROENG, E.C., LOVIK, M *et al.* - The fungal cell wall component beta-1,3-glucan has an adjuvant effect on the allergic response to ovalbumin in mice. **J Toxicol Environ Health A** **61**(1): 55-67, 2000.
- OSTROFF, G.R., EASSON, Jr. & JAMAS, S. - A New β -Glucan-based macrophage-target adjuvant. In: _____ - **Polymeric drugs and drug delivery systems**. Alpha-Beta Technology, Worcester, MA, 1991. pp. 52-59.
- PARHAM, P., ed. - **O sistema immune**. Artmed, Porto Alegre, 2001. 202-240 pp.
- PAQUET, P. & PIERARD, G. E. - Interleukin-6 e the skin. **Int Arch Allergy Immunol** **109**(4): 308-17, 1996.
- PARK, A. Y., HONDOWICZ, B. D. *et al.* - IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection. **Journal of Immunology** **165**(2): 896-902, 2000.

- PASSOLD, J. F. – **Efeito imunomodulador de diferentes adjuvantes na resposta à vacinação anti-rábica experimental.** Florianópolis, 2001. [Relatório Cnpq – Universidade Federal de Santa Catarina]
- PAUL, W. E., ed. - **Fundamental Immunology.** New York , Raven Press,1993.
- PÉREZ FILGUEIRA , D.M. , WIGDOROVITZ, A., ZAMORANO, P.I. *et al.* - Effect of Mycobacterium sp. wall and Avridine on the antibody response, IgG isotype profile and proliferative response induced by foot and mouth disease virus (FMDV) vaccination in cattle. **Vaccine 17:** 345-352, 1999.
- POWEL M. F., EASTMAN D. J., LIMA ,A. *et al.* - Effect of adjuvants on immunogenicity of MN recombinant glycoprotein 120 in guinea pigs. **AIDS Res. Human Retrovir**, 11-203, 1995.
- PRETO, A. A.; FERNANDES, M.J. *et al.* - Preparação da vacina anti-rábica PV/BHK em emulsão oleosa e avaliação do poder imunogênico em bovinos. **Arq Biol Tecnol 34** 609-16, 1991.
- RAEKALLIO, J. & NIEMINEN, L. - On the enzymatic response to injury and its mediators. **Med Biol 57(4):** 211-9, 1979.
- RAJANANTHANAN, P., ATTARD, G.S., SHEIKH, N.A. *et al.* – Novel aggregate structure adjuvants modulate lymphocyte proliferation and Th1 and Th2 cytokine profiles in ovalbumin immunized mice. **Vaccine 18:** 140-152, 2000.
- RAMPART, M., DE SMET, W. *et al.* - Inflammatory properties of recombinant tumor necrosis factor in rabbit skin in vivo. **J Exp Med 169(6):** 2227-32, 1989.
- RAMPART, M., VAN DAMME, J. *et al.* - Granulocyte chemotactic protein/interleukin-8 induces plasma leakage e neutrophil accumulation in rabbit skin. **Am J Pathol 135(1):** 21-5, 1989.
- RATNOFF, W. D. Inherited deficiencies of complement in rheumatic diseases. **Rheum Dis Clin North Am 22:**75–94, 1996.
- REED, S. G. & SCOTT, P. - T-cell e cytokine responses in leishmaniasis. **Current Opinion in Immunology 5(4):** 524-31, 1993.
- REHMANI, S. F. & SPRADBROW, P.B. – The influence of adjuvants on oral vaccination of chickens against Newcastle disease. **Veterinary Microbiology 46:** 63-68, 1995.

- RIZZA, P., FERRANTINI, M., CAPONE, I. *et al.* - Cytokines as natural adjuvants for vaccines: where are we now? **Trends in Immunology** **23**(8): 381-383, 2002.
- ROBBINS, S. & COTRAN, R., eds. - **Pathologic basis of disease**. Philadelphia, WB Saunders, 1979. pp. 59-63.
- ROBBINS, S. L., COTRAN, R. S. & KUMAR, V., eds. - **Patologia Estrurural e Funcional**, Rio de Janeiro, Guanabara koogan, 1991. p. 45-83.
- ROITT, I., BROSTOFF, J. & MALE, D., eds. - **Immunology**, London, Editora Mosby, 1998. pp.61-69.
- RYLANDER, R. - The role of endotoxin for reactions after exposure to cotton dust. **Am J Ind Med** **12**(6): 687-97, 1987.
- RWEYEMAMU M. M., UMEHARA O. *et al.* - Efficacy of avridine as an adjuvant for Newcastle disease vírus antigen in chickens. **Am. J. vet.** **47**:1243 – 1248, 1986.
- SADICK, M. D., HEIZEL, F. P. *et al.* - Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. **Journal of Experimental Medicine** **171**(1): 115-27, 1990.
- SADICK, M. D., STREET, N. *et al.* - Cytokine regulation of murine leishmaniasis: interleukin 4 is not sufficient to mediate progressive disease in resistant C57BL/6 mice. **Infection & Immunity** **59**(12): 4710-4, 1991.
- SADIR, A.M., ZAMORANO, P.I., ROMERA, A. *et al.* - Improvement of the immune response to foot and mouth disease vírus vaccine in calves by using Avridine as adjuvant. **Vet. Immunol. Immunopathol.** **69** (1): 11-22, 1999.
- SANTAMARIA BABI, L. F., PEREZ SOLER, M. T. *et al.* - Skin-homing T cells in human cutaneous allergic inflammation. **Immunol Res** **14**(4): 317-24, 1995.
- SCHARTON, T. M. & SCOTT, P. - Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets e induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **Journal of Experimental Medicine** **178**(2): 567-77, 1993.
- SCHIRMBECK R., MELBER K., KUHROBER, A. *et al.* - Immunization with soluble Hepatitis B virus surface protein elicits murine H-2 class I-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses *in vivo*. **J. Immunol.** **152**: 1110-1119, 1994.

- SCHIRMBECK R., MELBER K., MERTENS T., REIMAN J. - Antibody and cytotoxic T-cell responses to soluble hepatitis B virus (HBV) antigen in mice: implication for the pathogenesis of HBV-induced hepatitis. **J. Virol**, 68-1418, 1994.
- SCHILD, H., DERES, K., WEISMULLER, K-H. *et al.* - Efficiency of peptides and lipopeptides for *in vivo* priming of virus-specific cytotoxic T cells. **Eur. J. Immunol.** **121**: 2649-2654, 1991.
- SCHMIDT, K. L., OTT, V. R. *et al.* - Heat, cold and inflammation. **Z Rheumatol** **38**(11-12): 391-404, 1979.
- SCHOLZEN, T. E., BRZOSKA, T. *et al.* - Effect of ultraviolet light on the release of neuropeptides e neuroendocrine hormones in the skin: mediators of photodermatitis e cutaneous inflammation. **J Investig Dermatol Symp Proc** **4**(1): 55-60, 1999.
- SCHUBERT, C., CHRISTOPHERS, E. *et al.* - Transendothelial cell diapedesis of neutrophils in inflamed human skin. **Arch Dermatol Res** **281**(7): 475-81, 1989.
- SCOTT, P. & SCHARTON, T. - Interaction between the innate e the acquired immune system following infection of different mouse strains with *Leishmania major*. **Annals of the New York Academy of Sciences** **730**: 84-92, 1994.
- SHI, Y., ZHENG, W. & ROCK, K. L. - Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic T cell responses. **PNAS** **97**(26) : 14590–1459, 2000.
- SIN, Y. M. & WONG, M. K. - Effect of sodium aurothiomalate on carrageenan induced inflammation of the air pouch in mice. **Ann Rheum Dis** **51**(1): 112-6, 1992.
- SINGH, M. & O'HAGAN, D. - Advances in vaccine adjuvants. **Nature Biotechnology** **17**: 1075-81, 1999.
- SMITH, A. L., ROSE, M. E. *et al.* - The role of natural killer cells in resistance to coccidiosis - investigations in a murine model. **Clinical & Experimental Immunology** **97**(2): 273-279, 1994.
- SMITH, H. R., LARSEN, G. L. *et al.* - Inflammatory cells e eicosanoid mediators in subjects with late asthmatic responses e increases in airway responsiveness. **J Allergy Clin Immunol** **89**(6): 1076-84, 1992.
- SOUZA, C. A., CUNHA, F. Q. *et al.* - Inflammatory edema e migration of leucocytes but not phagocytosis are reduced in young rats. **Braz J Med Biol Res** **27**(3): 663-70, 1994.

- SOUZA, H. S., ELIA, C. C. *et al.* - Expression of lymphocyte-endothelial receptor-ligand pairs, alpha4beta7/MAdCAM-1 e OX40/OX40 ligand in the colon e jejunum of patients with inflammatory bowel disease. **Gut** **45**(6): 856-63, 1999.
- SPOLJAR, B.H., CIMBORA, T., HANZL-DUJMOVIC, I. *et al.* - Influence of adjuvant-active peptidoglycan monomer on specific T cell responses in mice. **Vaccine** **20**: 3543-3550, 2002.
- SPRIGGS, D.R. & KOFF, W.C., eds. - **Topics in vaccine adjuvant research**. CRC Press, Boca Raton, FL, 1991.
- STADECKER, M. The shrinking schistosomal egg granuloma: how accessory cells control T cell-mediated pathology. **Exp Parasitol** **79**:198–201, 1994.
- STWART, R. J, HOLLOWAY, L. J., ISBISTER, W. H. Peritoneal neutrophilia: a potential indicator of the surgical acute abdomen. **Aust N Z J Surg** **54**(6):565-8, 1984.
- TAKAHASHI, H., TAKESHITA, T., MREIN, B. *et al.* - Induction of CD8 +Cytotoxic T-cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMS. **Nature** **344**: 873-875, 1990.
- TAKAHASHI, I. & KIYONO, H. Gut as the largest immunologic tissue. **JPEN J Parenter Enteral Nutr** **23**(5 Suppl): S7-12, 1999.
- TCHRVENKOV, J. I., LATTER, D. A. *et al.* - Altered leukocyte delivery to specific e nonspecific inflammatory skin lesions following burn injury. **J Trauma** **28**(5): 582-8, 1988.
- TERUI, T., OZAWA, M. *et al.* - Role of neutrophils in induction of acute inflammation in T-cell-mediated immune dermatosis, psoriasis: a neutrophil-associated inflammation-boosting loop. **Exp Dermatol** **9**(1): 1-10, 2000.
- THEPEN, T., VAN VUUREN, A. J. *et al.* - Resolution of cutaneous inflammation after local elimination of macrophages. **Nat Biotechnol** **18**(1): 48-51, 2000.
- TROWBRIDGE, H. O. & EMLING, R. C., ed. – **Inflammation**. 5^a ed. Chicago, Quintessence Publishing Co, Inc, 1997. 236p.
- VALLE, M. R., MONTERO, C., MACHADO, H. *et al.* - The evaluation of yeast derivatives as adjuvants for the immune response to the Bm86 antigen in cattle. **BMC Biotechnology** **1**(2):1-7, 2001.

- VILLARREAL-RAMOS, B., MANSER, J. M., COLLINS, R. A. *et al.* - Cattle immune responses to tetanus toxoid elicited by recombinant *S. typhimurium* vaccines or tetanus toxoid in alum or Freund's adjuvant. **Vaccine** **18**: 1515-1521, 2000.
- VINGSBO C., JONSSON, R. & HOLMDAHL, R. - Avridine-induced arthritis in rats; a T cell-dependent chronic disease influenced both by MHC genes and by non-MHC genes. **Clin Exp Immunol** **99**(3):359-63,1995.
- WALLACE M. D. - An Advancement in Veterinary Adjuvant Technology. **Equine Practique**, **18** (6):15-18, 1996.
- WARD, P. A. - Role of complement, chemokines, and regulatory cytokines in acute lung injury. **Ann NY Acad Sci** **796**:104-112, 1996.
- WHYTE, A., LICENCE, S. T. *et al.* - Lymphocyte subsets and adhesion molecules in cutaneous inflammation induced by inflammatory agonists: correlation between E-selectin e gamma delta TcR+ lymphocytes. **Lab Invest** **75**(3): 439-49, 1996.
- WHITE, M. V. - The role of histamine in allergic diseases. **J Allergy Clin Immunol** **86**(4 Pt 2): 599-605, 1990.
- WHITE, W.I., CASSAT, D.R., MADSEN, J. *et al.* - Antibody and cytotoxic T-lymphocyte responses to a single liposome-associated peptide antigen. **Vaccine** **13**(12): 1111-1122, 1995.
- WIGDOROVITZ, A., ZAMORANO, M. V. B. & SADIR, A. M. - Modulation of the antigen presentation activity in foot and mouth disease virus (FMDV) vaccines by two adjuvants: avridine and water soluble fraction of *Mycubacterium* sp. **Vaccine** **16**(17): 1627-1632, 1998.
- WILLIAMS D. L., COOK J. A., HOFFMANN E. O. & DI LUZIO N. R. - Protective effect of glucan in experimentally induces candidiadid. **J. Reticuloendotelial. Soc.** 479-490, 1978.
- WILLOUGHBY, D. A., SEDGWICK, A. D. *et al.* - The use of the air pouch to study experimental synovitis e cartilage breakdown. **Biomed Pharmacother** **40**(2): 45-9, 1986.
- WU, J.Y., GARDNER, B.H., MURPHY, C.I. *et al.* - Saponin adjuvant enhancement of antigen-especific immune responses to an experimental HIV-1 vaccine. **J. Immunol.** **148**: 1519-1525, 1992.

- WUNN, T. A, CHEEVER, A. W. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Curr Opin Immunol** 7:505–511, 1995.
- YOSHINO, S.; CROMARTIE, W.J. *et al.* - Inflammation induced by bacterial cell wall fragments in the rat air pouch. Comparison of rat strains and measurement of arachidonic acid metabolites. **Am J Pathol** , **121** (2):327-36, 1985.
- ZACHARIAE, C. O. - Chemotactic cytokines and inflammation. Biological properties of the lymphocyte e monocyte chemotactic factors ELCF, MCAF e IL-8. **Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)** **181**: 1-37, 1993.
- ZURIER, R. B., ROSSETTI, R. G. *et al.* - Dimethylheptyl-THC-11 oic acid: a nonpsychoactive antiinflammatory agent with a cannabinoid template structure. **Arthritis Rheum** **41**(1): 163-70, 1998.