Catarina Joelma Magalhães Braga

Pesquisa de novos adjuvantes para vacinas terapêuticas

Tese apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão corrigida: Versão original se encontra arquivada no Serviço de Comunicação do ICB.

São Paulo
2011

RESUMO

BRAGA, C. J. M. **Pesquisa de novos adjuvantes para vacinas terapêuticas.** 2011. 159 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A busca por adjuvantes capazes de estimular eficiente resposta imunológica celular representa uma importante contribuição para a pesquisa de vacinas. No presente trabalho avaliamos o potencial adjuvante de flagelinas de *Salmonella* para a ativação de linfócitos T, com ênfase na ativação de linfócitos T $CD8^+$. Para este fim, animais foram submetidos a diferentes estratégias vacinais que incluíram vacinas baseadas em linhagens atenuadas de *Salmonella* nas quais flagelinas híbridas foram expressas fusionadas geneticamente ao antígeno alvo; vacinas acelulares que empregaram flagelinas purificadas co-administradas, ou em fusão, a antígenos alvo e, ainda, vacinas de DNA que codificam para flagelina fusionada ao antígeno alvo. Além disso, utilizamos alguns dos principais antígenos envolvidos no desenvolvimento de vacinas contra AIDS, câncer cervical, malária e paracoccidioidomicose para avaliação da ativação de células T $CD8^+$, e quando possível de células T $CD4^+$. Os resultados obtidos demonstram que a flagelina, na forma de proteína purificada, foi capaz de promover discreta ativação de linfócitos $TCD4^+$ e T $CD8^+$ específicos. Os resultados indicam que o efeito adjuvante pode ser acentuado quando antígeno e flagelina são fisicamente ligados. No entanto, esse requerimento não foi observado quando antígenos peptídeos são utilizados, ou ainda, quando resposta humoral ou de células T $CD4^+$ são desejadas. Por fim, nossos resultados demonstram que a utilização de flagelina na forma de vacina de DNA induziu maior proteção terapêutica que a mesma formulação utilizada na forma de vacinas de subunidades, sugerindo que os efeitos adjuvantes da flagelina para ativação de CTLs estão relacionados não apenas a ligação ao TLR5, mas também ao IPAF/Naip5. Os resultados apresentados no presente trabalho contribuem de forma significativa para a compreensão dos mecanismos de adjuvanticidade da flagelina de *Salmonella*, particularmente no contexto da ativação de respostas mediadas por células T.

Palavras-chave: Adjuvante. Flagelina. Células T. *Salmonella*. Vacinas Terapêuticas.

ABSTRACT

BRAGA, C. J. M. **Development of New Adjuvants for Therapeutic vaccine.** 2011. 159 p. Ph. D. thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The search for adjuvants that are able to stimulate an efficient cellular immune response represents an important contribution in vaccine development. In this study, we evaluated the potential of *Salmonella* flagellin as adjuvant for activation of T lymphocytes, with emphasis on the activation of $CD8^+$ T cells. To this end, mice were submitted to different approaches such as vaccines based on attenuated *Salmonella* strains that expressed hybrid flagellin genetically fusioned to antigen; acellular vaccines with purified flagellin co-administered or genetically fusioned to the target antigen; or even DNA vaccines that encode flagellin genetically fusioned to antigen. In addition, we explored some of the major antigens involved in the development of vaccines against AIDS, cervical cancer, malaria and PCM to assess the activation of $CD8^+$ T cells, and when possible of $CD4^+$ T cells. Purified flagellins were able to promote activation discreet of antigen-specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. The results also suggest that the adjuvant effect may be enhanced when antigen and flagellin are physically linked, but this is a requirement only for protein antigens and it is not required when antigen peptides are used, or when humoral immune response or $CD4^+$ T cells activation are desired. Finally, our results demonstrate that the use of flagellin in the form of DNA vaccines induced greater therapeutic protection than the same formulation used in the form of subunit vaccines, suggesting that the adjuvant effects of flagellin to the activation of CTLs are related not only to link to TLR5, but also to IPAF/Naip5. The results presented in this work contribute significantly to the understanding of the mechanisms of flagellin adjuvanticity, particularly in the context of activation of responses mediated by T cells.

Key words: Adjuvant. Flagellin. T cells. *Salmonella*. Therapeutic Vaccine.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Adjuvantes

A vacinação representa a estratégia de melhor custo-benefício para o controle de doenças infecciosas (O'HAGAN; VALIANTE, 2003). Ao longo da história, numerosas vacinas de sucesso foram desenvolvidas baseadas em microrganismos atenuados, inativados ou ainda nas toxinas que eles produzem como principais fatores de virulência. Dentre os exemplos de vacinas elaboradas a partir de microrganismos atenuados destacamos as vacinas contra varíola, rubéola, caxumba, sarampo, poliomelite e febre amarela; enquanto exemplos de vacinas elaboradas com microrganismos inteiros inativados, temos as vacinas contra a gripe, encefalite japonesa e coqueluche; e de toxinas transformadas em toxóides, temos as vacinas diftérica e tetânica. Apesar do sucesso, muitas dessas vacinas apresentaram efeitos adversos com a utilização em massa, o que impulsionou a busca por abordagens vacinais mais racionais, efetivas e, sobretudo, seguras. Assim, as vacinas contendo microrganismos inteiros foram substituídas por vacinas contendo antígenos altamente purificados ou ainda pela informação genética codificando antígenos relevantes do patógeno (O'HAGAN; RAPPUOLI, 2004). Infelizmente, vacinas baseadas em antígenos altamente purificados frequentemente induzem fraca resposta imunológica, tornando-se necessário a incorporação de adjuvantes para estimular adequadamente o sistema imunológico (PASHINE; VALIANTE; ULMER, 2005).

A palavra adjuvante deriva do latin "*adjuvare*" e significa "ajudar", sendo o termo adjuvante designado a qualquer composto capaz de aumentar a imonogenicidade intrínsica de um antígeno co-administrado ou modular a resposta imunológica naturalmente induzida contra o antígeno (KRIEG, 2007; LYCKE, 2010). Como conseqüência desta ampla definição, diferentes classes de compostos servem à função de adjuvante, como por exemplo, produtos de origem microbiana, sais minerais, citocinas, lipídeos, micropartículas, lipossomas, anticorpos dirigidos contra moléculas de superfície de APCs, dentre outros (PASHINE; VALIANTE; ULMER, 2005; BOSCARDIN et al., 2006). De acordo com o modo de ação, os adjuvantes podem ser classificados em dois tipos: imunopotencializadores e sistemas de entrega. Os imunopotencializadores ativam diretamente as células do sistema imunológico, enquanto os sistemas de entrega direcionam o(s) antígeno(s) e(ou) imunopotencializador(es) para alvos específicos do sistema imunológico, por

exemplo, células apresentadoras de antígenos (APCs) (O'HAGAN; VALIANTE, 2003).

Os sais de alumínio (Alum) foram os primeiros adjuvantes licenciados para uso em humanos e desde sua introdução em 1920 até meados do ano 2000 foram os únicos utilizados em vacinas. Uma importante característica dos sais de alumínio é que eles são excelentes indutores de imunidade humoral, mas contribuem muito pouco para o desenvolvimento de repostas celulares do tipo Th1 e ativação de linfócitos T $CD8^+$ (MIYAJI et al., 2011). É notável que durante quase um século esse adjuvante tenha sido utilizado sem o conhecimento preciso de seus mecanismos de ação, os quais foram elucidados apenas recentemente (DE GREGORIO; TRITTO; RAPPUOLI, 2008). De fato, a história de muitas vacinas de sucesso mostra que estas foram desenvolvidas empiricamente, utilizando-se métodos simples de inativação ou atenuação de patógenos ou de seus componentes. Contudo, o desenvolvimento de tais vacinas vai de encontro às exigências atuais, que requerem alta efetividade e longa duração, na ausência de efeitos adversos. Além disso, o âmbito de atuação das vacinas expandiu para além da profilaxia de doenças infecciosas, sendo utilizadas também no tratamento de muitas desordens patológicas ou condições fisiológicas anômalas tais como alergias, doenças auto-imunes, cânceres, demência (Alzheimer) e dependência química, ou mesmo na imunoterapia de doenças infecciosas crônicas, as quais não podem ser amenizadas por vacinas inativadas ou atenuadas, e para as quais Alum não exerce o efeito desejado.

A busca por novos adjuvantes para uso em humanos representa uma área em expansão na pesquisa médica. No entanto, nos últimos 15 anos apenas três adjuvantes: MF59 e AS03, duas emulsões formadas pela mistura de esqualeno ($C_{30}H_{50}$) em água (DUPUIS et al., 2001; GIUDICE, 2006) e o monofosforil lipídeo A (MPL), a forma detoxificada do LPS produzida a partir de *Salmonella* Minnessota (DIDIERLAURENT et al*.,* 2004) foram licenciados na Europa para uso em humanos nas formulações das vacinas FLUAD® (anti-influenza), Pandemrix® (A/H1N1) e Fendrix® (anti-HBV), respectivamente (PASHINE; VALIANTE; ULMER, 2005; MIYAJI et al., 2011). Além disso, muitos outros adjuvantes estão em fase de avaliação em ensaios pré-clínicos e clínicos ou aguardando validação; o que em geral é um processo lento, reflexo dos custos de desenvolvimento e restrições reguladoras atualmente requeridas para licenciamento.

A escassez de adjuvantes licenciados para uso em humanos mostra que existe uma carência de adjuvantes, principalmente para ativação de linfócitos T $CD4^+$ Th1 e linfócitos T $CD8^+$, e essa carência pode ser apontada como um dos principais obstáculos para o desenvolvimento de vacinas efetivas para o controle de doenças como malária, Chagas, AIDS, tuberculose e muitos tipos de cânceres, as quais requerem não apenas a imunidade mediada por anticorpos mas também a intervenção de linfócitos T citotóxicos (CTLs).

A descoberta de que para o adequado desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa (mediada por linfócitos B, T $CD4^+$ e T $CD8^+$) é necessária a ativação inicial de componentes da imunidade inata, revolucionou o conhecimento sobre como as vacinas trabalham para estimular o sistema imunológico. Hoje é amplamente difundido que a eficácia de uma vacina está intimamente relacionada ao seu potencial para ativar células da imunidade inata, sobretudo APCs tais como macrófagos e células dendríticas (DCs). Enquanto a ativação de linfócitos B virgens pode ocorrer diretamente pela ligação de seus receptores a antígenos solúveis ou na superfície do patógeno, a ativação de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ é restrita ao reconhecimento do antígeno no contexto MHC-II e MHC-I, respectivamente. Além disso, essas células necessitam de outros sinais, como moléculas co-estimuladoras e citocinas para que possam se diferenciar em células efetoras e de memória. As DCs são consideradas as mais potentes das APCs para estimulação de células T virgens, pois quando ativadas apresentam altos níveis de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80/86), aumentam a expressão de moléculas MHC e secretam citocinas pró-inflamatórias que promovem a diferenciação de linfócitos T $CD4^+$ em células Th1 ou Th2, ou de linfócitos T $CD8^+$ em CTLs (Figura 1). Além disso, células T $CD4^+$ são imprescindíveis para o desenvolvimento de linfócitos B efetores e de memória para antígenos timo-dependentes, e também fornecem estímulo para manutenção de linfócitos T $CD8^+$ de memória. DCs são consideradas ainda APCs profissionais uma vez que são especializadas na captura de antígenos nos sítios periféricos (mucosas e pele) e transporte/apresentação destes aos linfócitos concentrados nos órgãos linfóides secundários (linfonodos e baço), aumentando a probabilidade do encontro com o antígeno (STEINMAN; POPE, 2002; O'HAGAN; VALIANTE, 2003; CHUNG et al., 2004).

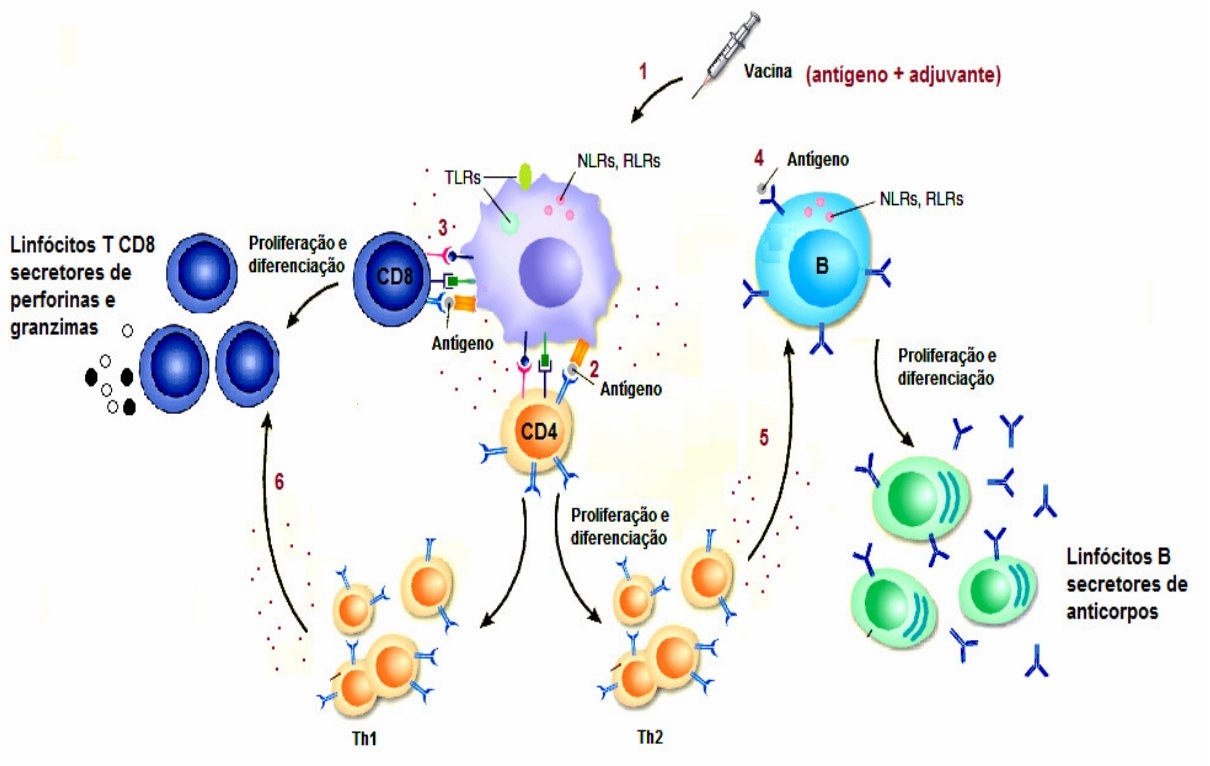

Figura 1 – Iniciação da resposta imunológica adaptativa. Células dendríticas são ativadas após a interação de PAMPS (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) com receptores da imunidade inata (TLRs, NLRs, RLRs) (1). DCs ativadas secretam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias enquanto apresentam em sua superfície moléculas co-estimuladoras e peptídeos derivados do antígeno em associação ao complexo MHC-II, para linfócitos T $CD4^+$ (2); ou MHC-I, para linfócitos T $CD8^+$ (3) promovendo a proliferação e a diferenciação destes. Linfócitos T $CD8^+$ se diferenciam em células T citotóxicas (CTLs) que matam células infectadas ou tumorais, enquanto linfócitos T $CD4^+$ se diferenciam em células T auxiliares (Th) do tipo Th1 ou Th2, que auxilam na diferenciação de CTLs (6) e células B (5), bem como no desenvolvimento de células de memória. Além disso, linfócitos B podem sofrer proliferação clonal e diferenciação em células secretoras de anticorpos (plasmócitos) pela ligação direta do antígeno a Igs de membrana, no entanto, é imprescindível o auxilío dos linfócitos T $CD4^+$ para a produção de anticorpos de alta qualidade (4). Fonte: Baseado em Krieg (2007).

Estudos recentes demonstraram que a ativação/maturação de DCs pode ser iniciada pela ligação de produtos solúveis a seus receptores. Desta forma, o emprego de adjuvantes que ativam DCs representa uma prioridade para o aumento da eficácia das vacinas. Além disso, a descoberta dos receptores Toll-like (TLRs) e seu papel na ativação de APCs impulsionou o desenvolvimento de vacinas, uma vez que a identificação e manipulação de seus ligantes oferecem a oportunidade para o desenvolvimento de novos adjuvantes. De fato, muitos agonistas de Toll estão sendo avaliados em ensaios pré-clínicos e clínicos. Dentre esses destacamos: MPL,

flagelina, CpG DNA (DNA de origem bacteriana rico em seqüências de citosina e guanosina não metiladas), ssRNA (RNA de fita simples), dsRNA (RNA fita dupla) e imidazol-quinoline. Além disso, algumas toxinas bacterians como a toxina colérica (CT) produzida por *Vibrio Cholerae*, toxina termo-lábil (LT) produzida por linhagens de *Escherichia coli* enterotoxigênicas, a toxina pertusis (PT) produzida por *Bordetella pertussis*, e ainda outros produtos como o peptídeo pan HLA-DR (PADRE), específico para células T $CD4^+$ (BARGIERI et al., 2008, 2010), proteínas de choque térmico (hsp) (do inglês "*heat shock protein"*), dentre outros também exercem efeito adjuvante e estão em avaliação (GOLDSTONE et al., 2002). Mais recentemente, algumas vias de sinalização celular estão em evidência como a via de sinalização mediada por receptores intracelulares Nod-like ("*Nod-like receptors*") e podem representar uma nova fonte de adjuvantes quando seus mecanimos de ação forem dissecados (DE GREGORIO; TRITTO; RAPPUOLI, 2008).

Apesar do acúmulo de conhecimentos sobre o sistema imunológico, interação patógeno-hospedeiro e identificação/produção de antígenos protetores, são notórias as dificuldades de traduzir essas informações em vacinas eficazes. Uma explicação plausível diz respeito à ausência de padronização de adjuvantes no tangente às características das respostas imunológicas que eles induzem, gerando divergências nos resultados obtidos; o que por sua vez é reflexo da contribuição de variáveis tais como o efeito intrínseco do adjuvante, a escolha e pureza do antígeno, a via de administração, a dose do antígeno e do adjuvante, o esquema de imunização; além de outras variáveis de difícil controle ou previsão como a genética do hospedeiro, status imunológico e a presença de condições fisiológicas ou patológicas. À luz dos conhecimentos atuais espera-se como qualidades de novos adjuvantes: (i) aumento da capacidade de reconhecimento antigênico em indivíduos classificados como maus respondedores; (ii) indução de respostas de longa duração (memória imunológica); (iii) indução de respostas imunológicas vigorosas em indivíduos imunocomprometidos fisiológicamente (neonatos, crianças e idosos) ou patologicamente (imunodeficientes ou transplantados); (iv) promoção de forte ativação de imunidade humoral, induzindo a produção de anticorpos com alta avidez e capacidade neutralizante e/ou resposta celular, ativando linfócitos T citotóxicos (CTL); (v) redução da quantidade de antígeno e do número de doses utilizadas, colaborando para a redução de custos e facilitação dos programas de vacinação em massa; (vi) ausência de toxicidade local e sistêmica, (vii) indução de resposta

imunológica em superfícies de mucosa, e (viii) facilidade de produção em larga escala (PASHINE; VALIANTE; ULMER, 2005). Além disso, é importante lembrar que o adjuvante pode encerrar uma ou mais dessas qualidades por diferentes mecanismos e, muitas vezes, a combinação de um ou mais adjuvantes será necessária para alcançar o efeito desejado.

1.2 Flagelina

Flagelina é a proteína mais abundante do flagelo bacteriano. Cerca de 20.000 a 100.000 cópias de flagelina são polimerizadas para formar o filamento flagelar, uma haste flexível e oca que, conectada ao gancho e ao corpo basal, formam a complexa estrutura denominada flagelo. O flagelo é exposto na superfície bacteriana e funciona como um propulsor mecânico, conferindo mobilidade à bactéria e um meio pelo qual estas podem aderir e invadir as células do hospedeiro (Figura 2) (NEWTON et al., 1991a; 1991b; YONEKURA; MAKI-YONEKURA; NAMBA, 2002; RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004; MURTHY et al., 2004; CUNNINGHAM et al., 2004). Dependendo da espécie bacteriana, a flagelina pode ter massa molecular que varia de 28 a 80 kDa, mas o alinhamento das seqüências de aminoácidos de diferentes flagelinas revelou que existe conservação de resíduos de aminoácidos localizados nas regiões N- e C- terminais. Por outro lado, a região central da molécula, apresenta-se altamente hipervariável tanto na composição de resíduos de aminoácidos quanto na extensão. Além disso, por meio do mecanismo de variação de fase, uma mesma espécie pode produzir diferentes tipos de flagelinas (WEI; JOYS, 1985; NEWTON; JACOB; STOCKER, 1989; YONEKURA; MAKI-YONEKURA; NAMBA, 2003; RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004).

A estrutura terciária da flagelina, formada pelo pareamento das regiões N- e C- terminais da molécula, assemelha-se a um "*boomerang*", sendo definidos quatro domínios: Os domínios D0 e D1, constituídos de estrutura alfa-hélice, são dispostos no centro do filamento flagelar; e os domínios D2 e D3, constituídos de folhas β-pregueada, são formados pela região central hipervariável e expostos na superfície do filamento flagelar **(**Figura 2**).** Os domínios D0 e D1 são indispensáveis para polimerização da flagelina e a conservação destes resíduos é um ponto chave para a montagem do filamento bacteriano e função de mobilidade. Por outro lado, a

região central hipervariável é rica em epítopos B e utilizada para distinção de bactérias baseada na sorotipagem do antígeno H (FLYNN et al., 1990; YONEKURA; MAKI-YONEKURA; NAMBA, 2003; RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004; MURTHY et al., 2004).

Em adição ao seu papel como constituinte do flagelo bacteriano, flagelinas, principalmente aquelas produzidas por Salmonelas, são reconhecidas como potentes indutores de resposta imunológica e por isso, utilizadas como adjuvante vacinal (MURTHY et al., 2004; CUNNINGHAM et al., 2004). Os mecanismos pelos quais a flagelina estimula o sistema imunológico são amplamente estudados e ocorrem, principalmente, pela ativação do receptor *"Toll-like receptor 5*" (TLR5) encontrado na superfície de monócitos, macrófagos, células dendríticas (DCs) e células epiteliais (Figura 3). A interação da flagelina com o TLR5 leva ao recrutamento de proteínas adaptadoras, incluindo o fator de diferenciação mielóide (MyD88), e à ativação/translocação do fator nuclear de transcrição (NF-κB) para o núcleo da célula, onde este promove a expressão de vários genes. Dentre os genes-alvo de NF-κB estão os genes de citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF-α, IFN-ɣ), de moléculas de adesão (ICAM, VCAM) e de enzimas induzíveis (iNOS e COX-2) (ZHANG; GHOSH, 2001; HONKO; MIZEL, 2005; APPLEQUIST et al., 2005). Além disso, a estimulação de TLR5 na superfície de DCs promove sua ativação e maturação, o que inclui aumento da expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC-I e MHC-II) e moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86 e CD40), bem como secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, o que torna essas células aptas para sensibilização de células T virgens (MCSORLEY; COOKSON; JENKINS, 2000; MCSORLEY; JENKINS, 2000; KAISHO; AKIRA, 2002; MCSORLEY et al., 2002; TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003; AKIRA; YAMAMOTO; TAKEDA, 2003; AKIRA; TAKEDA, 2004; CUADROS et al., 2004; PINO; MARTIN; MICHALEK, 2005; RAVINDRAN; MCSORLEY, 2005; HONKO; MIZEL, 2005; HONKO et al., 2006).

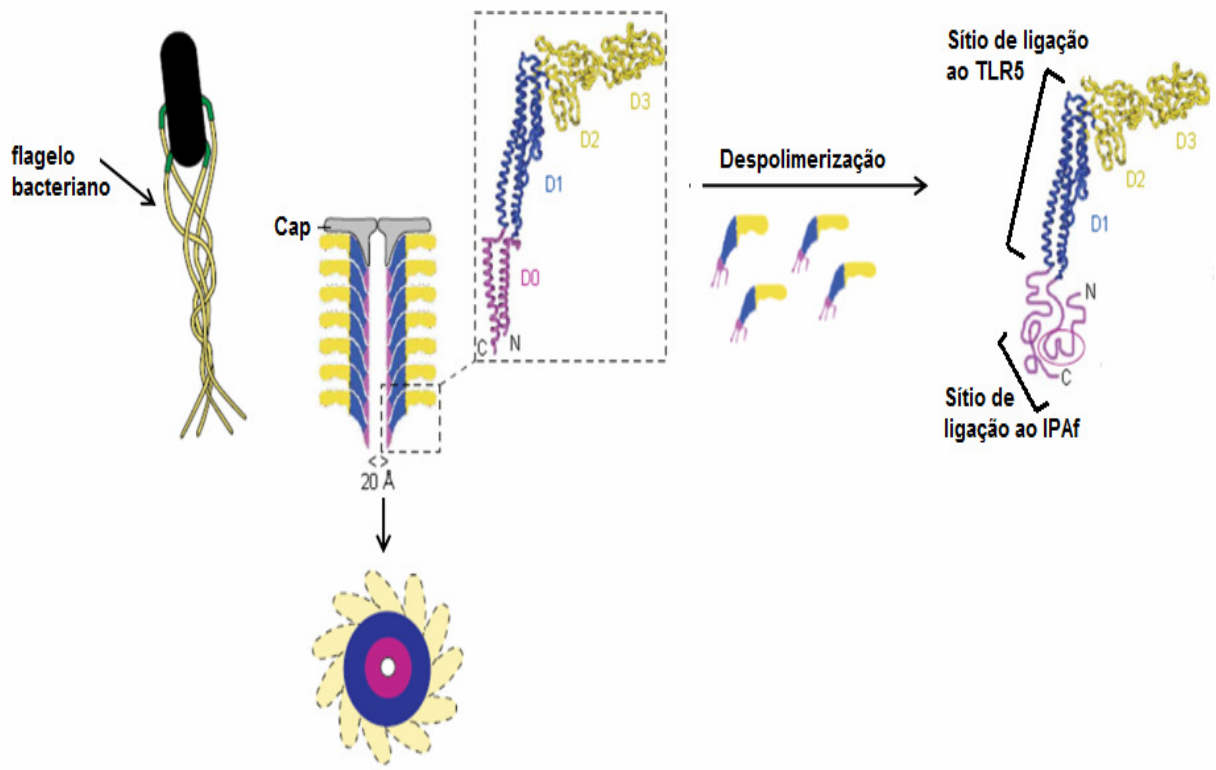

Figura 2 - Estrutura e organização da flagelina no flagelo. O flagelo é uma haste longa e flexível formada pelo corpo basal (responsável por seu ancoramento à parede celular bacteriana), o gancho (verde) e o filamento flagelar (amarelo). Os esquemas tranversal e longitudinal monstram como a flagelina é polimerizada para formar o filamento flagelar. Em destaque são apresentados os domínios da flagelina nas cores: púrpura (domínio D0) e azul (domínio D1) que representam as regiões conservadas da molécula, e em amarelo os domínios D2 e D3, que representam a porção hipervariável da molécula. Após a despolimeração o monômero de flagelina expõe os sítios de ligação aos receptores TLR5 (domínio D1) e IPAF/Naip5 (35 aa da região C-terminal, domínio D0).
Fonte: Modificado de Ramos, Rumbo, Sirard (2004).

Além disso, é importante destacar que a flagelina também é reconhecida por um complexo de receptores IPAF/Naip5 pertencente à família de receptores do tipo NOD "NOD-like receptors" (MIAO et al., 2007; LIGHTFIELD et al., 2008). Esses receptores formam complexos chamados inflamassomas e, ao contrário do TLR5 que responde a flagelina extracelular, IPAF/Naip5 responde a flagelina localizada no citoplasma das células (Figura 3). Além disso, a ligação da flagelina ao complexo IPAF/Naip5 leva à secreção das citocinas IL-1β, IL-18 e ativação da cisteína protease caspase-1, que leva a morte celular por piroptose. A piropitose compartilha algumas características com a apoptose e a necrose, logo, é um tipo de morte

celular programada dependente da atividade de sinalização dentro da célula, mas que resulta em perda de integridade de membrana e liberação do conteúdo citoplasmático no espaço extracelular, um evento altamente inflamatório. Embora a ligação de flagelina ao IPAF/Naip5 desencadeie resposta inflamatória, a contribuição desta via de sinalização para seu efeito adjuvante permanece indeterminada, sendo estudada principalmente para compreensão dos mecanismos de patogenicidade de bactérias intracelulares flageladas como *Salmonella sp.*, *Legionella pneumophila* e *Listeria monocitogenes* (MIAO et al., 2007; LIGHTFIELD et al., 2008).

Recentemente foram mapeados na flagelina os resíduos de aminoácidos que participam da interação com o TLR5 e IPAF/Naip5, verificando-se que estes se encontram nos domínios D1 e D0, respectivamente (ANDERSEN-NISSEN et al., 2007; LIGHTFIELD et al., 2008). No entanto, esses domínios ficam escondidos no filamento flagelar, sendo necessário que a flagelina se encontre na forma monomérica para interação com TLR5 ou IPAF/Naip5, o que geralmente ocorre após liberação de flagelina monomérica por ruptura mecânica do flagelo em superfícies de mucosas ou ainda por inoculação acidental no citoplasma da célula via sistema de secreção do tipo III (SUN; ROLAN; TSOLIS, 2007; MIAO et al., 2007). Na forma monomérica o domínio D1 ainda apresenta estrutura em alfa-hélice, e esta conformação é indispensável para o reconhecimento pelo TLR5. Por outro lado, o domínio D0 apresenta-se sem estrutura, e seu reconhecimento por receptores NOD-like se dá por meio da ligação aos últimos trinta e cinco resíduos de aminoácidos da região C-terminal (LIGHTFIELD et al., 2008). É notável que o sistema imunológico tenha elaborado dois distintos mecanismos para o reconhecimento do mesmo produto microbiano, o que sugere que a flagelina funciona como um potente sinal de alerta capaz de ativar respostas imunológicas complexas. Além disso, a detecção de porções distintas da molécula, mas essenciais para função flagelar, fornece um meio pelo qual o sistema imunológico limita o escape do patógeno.

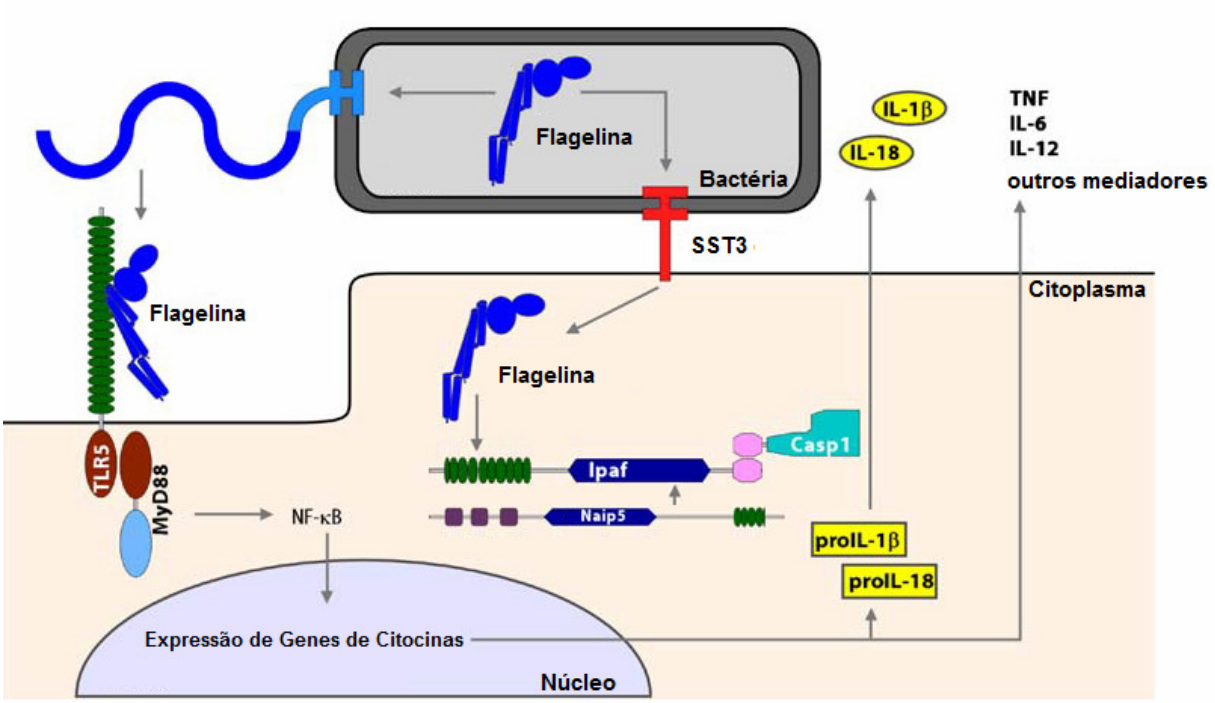

Figura 3 – Sinalização celular mediada por flagelina. TLR5 detecta monômeros de flagelina extracelular e ativa a cascata de sinalização dependente de MyD88, o que resulta na expressão de citocinas pró-inflamatórias. IPAF/Naip5 respondem à flagelina localizada no citoplasma da célula e levam a ativação de capase-1. IL-1β e IL-18 são duas citocinas que requerem dois estímulos para que sejam secretadas. TLR5 ou outros TLRs estimulam a expressão de pró-IL-1β e pró-IL-18, que são retidas no citoplasma. IPAF/Naip5 ativam caspase-1, que faz o processamento proteolítico de pró-IL-1β pró-IL-18, promovendo a secreção das citocinas na forma ativa.
Fonte: Modificado de Miao et al. (2007).

Devido suas características imunoestimuladoras intrínsicas, diferentes tipos de flagelinas derivadas de *Salmonella sp.* (FliC*d*, FliC*i*, FljB) foram utilizadas como adjuvante em formulações vacinais destinadas para ativação de resposta humoral e celular. As primeiras abordagens utilizando flagelinas de *Salmonella* iniciaram com o grupo do Dr. Bruce Stocker em 1989 (NEWTON; JACOB; STOCKER, 1989). A estratégia proposta inicialmente consistia na clonagem de oligonucleotídeos sintéticos codificando epítopos para ativação de linfócitos B, T $CD4^+$ ou T $CD8^+$, na região central hipervariável do gene responsável pela codificação da flagelina, e posterior expressão do flagelo híbrido por linhagens atenuadas de Salmonelas que eram administradas pela via intraperitoneal. A primeira experiência utilizando o sistema *Salmonella*-flagelina para apresentação de antígenos heterólogos foi realizada para expressão do epítopo CTP-3 derivado da subunidade B da toxina

colérica (CT). Após imunização parenteral com *Salmonella* vacinal codificando flagelo híbrido, os camundongos desenvolveram altos títulos de anticorpos capazes de reconhecer a toxina na forma nativa (NEWTON; JACOB; STOCKER, 1989). Esses resultados despertaram o interesse de alguns grupos de pesquisa que utilizaram a mesma abordagem em formulações vacinais para obtenção de resposta imunológica humoral e celular frente a diferentes antígenos (NEWTON et al., 1991a, 1991b, 1995; VERMA et al., 1995; MIZEL et al., 2003; MURTHY et al., 2004).

Modificações da proposta inicial de utilizar linhagens de *Salmonella* como carregadoras de antígenos heterólogos em fusão à flagelina, incluem a utilização de flagelinas purificadas. A descoberta do papel dos receptores TLRs na ativação de células da imunidade inata e da contribuição destas para o desenvolvimento de efetiva resposta adaptativa foram os responsáveis pela crescente utilização de flagelinas purificadas. Além disso, a flagelina agrega inúmeras vantagens não encontradas em outros agonistas de TLRs ou mesmo em adjuvantes atualmente avaliados em ensaios pré-clínicos e clínicos.

Recentemente algumas das vantagens da utilização flagelina de *S.* Typhimurium como adjuvante foram comprovadas em ensaios pré-clínicos e clínicos para vacinas de subunidades anti-influenza. Dentre estas vantagens estão: (i) efetividade em baixas doses (1-10 µg), como demonstrado em ensaios com camundongos, primatas não-humano e humanos; (ii) efetividade em idosos; (iii) ausência de resposta de IgE; (iv) ausência de efeitos adversos em animais (camundongo e coelho até 100 µg/dose) e em humanos (quando utilizada abaixo de 8 µg/dose); (v) o efeito adjuvante não é comprometido por imunidade humoral pré-existente; (vi) flagelina é uma molécula versátil, e pode ser administrada pela mistura com o antígeno de interesse ou na forma de proteína híbrida; onde sequências codificando epítopos ou mesmo proteínas inteiras são geneticamente fusionadas em várias partes da molécula sem comprometimento da ativação TLR5-dependente; (vii) facilidade de produção em larga escala e em condições GMP; (viii) administração por via parenteral e de mucosas (exceto a via oral uma vez que a flagelina monomérica é degradada) (JEON; BEN-YEDIDIA; ARNON, 2002; HULEATT et al., 2008; SONG et al., 2009; TREANOR et al., 2010; TURLEY et al., 2011). Além disso, flagelina pode ser incoporada em sistemas de entrega tais como nanopartículas (SALMAN; IRACHE; GAMAZO, 2009), lipossomas (FAHAM; ALTIN,

2010), VLPs (WANG et al., 2008), vacinas de DNA (APPLEQUIST et al., 2005), ou administrada com vacinas de primeira geração (SKOUNTZOU et al., 2009).

O primeiro trabalho que utilizou flagelina purificada como adjuvante vacinal foi realizado pelo grupo da Dra. Ruth Arnon (MCEWEN et al., 1992), onde foi demonstrado que flagelina híbrida purificada, fusionada geneticamente ao antígeno do vírus influenza, promoveu forte resposta de anticorpos na ausência de qualquer outro adjuvante. Em seguida, vários estudos foram publicados utilizando a fusão de epítopos ou proteínas inteiras a flagelinas de *Salmonella* (LUNA et al., 1997; BEN-YEDIDIA et al., 1999a, 1999b; JEON; BEN-YEDIDIA; ARNON, 2002; CUADROS et al., 2004; HULEATT et al., 2007; MIZEL et al., 2009; BARGIERI et al., 2008, 2010) ou mesmo de outras bactérias (LEE et al., 2006) como adjuvante vacinal. Entretanto, existe grande controvérsia na literatura sobre a utilização de flagelinas híbridas, e enquanto alguns autores sugerem que a ligação física do antígeno não é um fator imprescindível para o efeito adjuvante da flagelina (MCSORLEY et al., 2002; DIDIERLAURENT et al., 2004; APPLEQUIST et al., 2005; LEE et al., 2006; HONKO et al., 2006) outros apontam a necessidade de fusão como pré-requisito para sua adjuvanticidade (HULEATT et al., 2007; BATES et al., 2011).

O emprego de flagelina como adjuvante vacinal para ativação de resposta humoral é vasto e foi recentemente revisado por Bates et al. (2011). No entanto, seu uso como adjuvante capaz de ativar imunidade mediada por células T $CD4^+$ (MCSORLEY et al., 2002; BRAGA et al., 2009) e, principalmente por células T $CD8^+$ (CUADROS et al., 2004; HULEATT et al., 2007; BRAGA et al., 2010) é bastante reduzido e permeado por resultados conflitantes, onde em um dado modelo flagelina apresenta substancial efeito adjuvante para células T $CD8^+$ (CUADROS et al., 2004; HULEATT et al., 2007; BRAGA et al., 2010); enquanto em outros modelos não (SCHWARZ et al., 2003; DIDIERLAURENT et al., 2004). Além disso, o trabalho recentemente publicado pelo grupo do Dr. Mizel demonstrou que a flagelina promoveu ativação e proliferação de células T $CD8^+$ OVA-específica independente da via TLR5, embora o exato mecanismo não esteja completamente elucidado (BATES et al., 2011).

Nos últimos cinco anos, a flagelina revelou-se um adjuvante complexo cujos efeitos não refletem apenas a ativação dos receptores TLR5 ou IPAF/Naip5, mas mantém estreita relação com a natureza do antígeno, a forma como a flagelina é administrada, a via de administração e também o modelo estudado. Apesar de todas

as características que fazem da flagelina um adjuvante ideal para uso em humanos e também para outras aplicações médicas (como radioimunoprotetor), sua utilização deve ser acompanhada de intensa pesquisa que permita compreender a complexidade das respostas imunológicas que esta molécula desencadeia, principalmente para o controle de patógenos intracelulares e cânceres onde a ativação de células T $CD8^+$ é requerida.

1.3 Modelos de antígenos utilizados

As vacinas disponíveis até o momento são de aplicação profilática, mas existe uma grande necessidade de pesquisas direcionadas para elaboração de abordagens terapêuticas. As vacinas terapêuticas funcionam como substitutos ou auxiliares de terapias já existentes e representam uma alternativa de suporte imunológico para o tratamento de doenças infecciosas crônicas e algumas formas de câncer. A principal característica deste tipo de abordagem é a geração de linfócitos T citotóxicos responsáveis pela destruição de células infectadas ou transformadas. Enquanto anticorpos exercem papel chave na neutralização do patógeno, os linfócitos T $CD8^+$ citotóxicos podem destruir células infectadas e impedir a progressão da doença (AUTRAN et al., 2004a, 2004b). Neste trabalho utilizamos os antígenos p24 do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1); E7 do vírus do papiloma humano (HPV-16); CS do *Plasmodium yoelli* e gp43 do *Paracoccidioides brasilienses* como modelos para estudar o potencial adjuvante de flagelinas de *Salmonella sp.* para ativação de respostas celulares. A escolha destes antígenos foi fundamentada na importância da resposta celular antígeno-específica e proteção contra estas patologias. De um modo geral, complicações destas doenças surgem como resultado de resposta imune celular inadequada para a eliminação de patógenos intracelulares ou pela indução de tolerância imunológica.

1.3.1 Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e o HIV

O HIV é um vírus envelopado com genoma constituído por duas fitas simples de RNA (extensão de 9.800 pares de bases) que codificam três genes essenciais para a replicação e estrutura viral (*gag*, *env*, *pol*) e outros seis genes acessórios com funções reguladoras, sobretudo do ciclo reprodutivo. O gene *gag* codifica as

proteínas estruturais do capsídeo viral; o gene *env* codifica as glicoproteínas (gp120 e gp41) do envelop, as quais são fundamentais para a adesão viral e entrada do vírus na célula hospedeira; e o gene *pol* codifica as proteínas não-estruturais necessárias à replicação do vírus, incluindo as enzimas transcriptase reversa (RT), protease (PR) e integrase (IN). O gene *gag* codifica uma poliproteína Gag de 55kDa que é proteoliticamente clivada durante a maturação do vírus originando as proteínas da matriz (p17), do capsídeo (p24), do nucleocapsídeo (p7/p9) e outros produtos de baixo peso molecular (p1, p2 e p6). Além desses, outros genes codificados pelo HIV são *vif* (que codifica um fator de infectividade do vírus), *vpr* (que codifica proteínas virais), *tat* (que codifica um transativador), *rev* (que codifica um regulador da expressão das proteínas do vírus), *nef* (que codifica o fator regulador negativo) e *vpu* (que codifica a proteína viral U). Destes genes, três (*tat*, *rev* e *nef*) codificam proteínas reguladoras que controlam a expressão dos genes estruturais *gag*, *env* e *pol* (SLEASMAN; GOODENOW, 2003).

Estima-se que mais de 40 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas com o HIV. A introdução de uma política de acesso universal ao tratamento anti-retroviral fez com que as taxas de mortalidade diminuíssem e estabilizassem, mas novos casos da infecção continuam a surgir e, associado ao número de indivíduos já infectados e que não respondem aos esquemas terapêuticos atuais, apontam para a necessidade de intervenções mais efetivas.

Nos últimos 20 anos, pesquisas voltadas para o desenvolvimento de uma vacina contra a AIDS demonstraram que a proteção contra a doença depende da ativação de respostas celulares específicas responsáveis pela destruição de células infectadas pelo vírus e não apenas da produção de anticorpos neutralizantes direcionados a proteínas do envoltório viral. As estratégias para desenvolver uma vacina terapêutica contra HIV/AIDS são direcionadas a epítopos virais, particularmente abundantes em algumas proteínas como a Gag, Nef e Pol (GAHERY-SEGARD et al., 2003; BOLESTA et al., 2005). De um modo geral estas formulações buscam a ativação de respostas celulares, especialmente de linfócitos T $CD8^+$ devido o reconhecido papel destas células no controle da carga viral (OGG et al., 1998). Porém, a estimulação de células T $CD4^+$ também deve ser abordada uma vez que esta população celular é fundamental para o desenvolvimento de CTLs e manutenção de células T $CD8^+$ de memória. De fato, durante a infecção natural pelo HIV-1, a indução de respostas mediadas por células T $CD8^+$ tem correlação direta

com a diminuição da carga viral (BORROW et al., 1994). Além disso, o papel protetor mediado por linfócitos T $CD8^+$ foi estabelecido a partir de estudos feitos em símios desafiados com o SIV (vírus da imunodeficiência em símios) (BORROW et al., 1994; MCMICHAEL, 2006). Dados recentes sugerem que a proteína Gag(p24) é uma forte candidata à construção de uma vacina terapêutica anti-HIV, uma vez que a presença de células $CD8^+$ p24-específicas têm correlação inversa com a progressão da doença (ROSENBERG et al., 1997; OGG et al., 1998). Desse modo, o antígeno p24 foi escolhido para avaliação do potencial adjuvante de flagelina de *Salmonella* no contexto da ativação de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$.

1.3.2 Câncer cervical e o HPV

HPV é um vírus não envelopado com genoma consituído por dupla fita de DNA circular (extensão de 8.000 pares de bases) que codifica dois genes de expressão tardia *L1* e *L2* (L, do inglês *late*), e seis genes de expressão precoce *E1, E2, E4, E5, E6* e *E7* (E, do inglês "*early*"). Os genes *L1* e *L2* codificam as proteínas estruturais do capsídeo viral L1 e L2; enquanto os genes *E1-7* cofificam as proteínas E1-7, as quais exercem papel na regulação do ciclo viral, controlando a replicação do DNA viral (E1 e E2), transcrição de RNA viral (E2), montagem das partículas virais (E4) e o ciclo celular (E5, E6 e E7).

O HPV está associado com cerca de 99% dos casos de câncer cervical, com destaque para o HPV-16, como tipo viral de alto risco para o desenvolvimento de câncer de colo de útero. Embora campanhas de prevenção, como o exame Papanicolau, sejam amplamente adotadas, novos casos de câncer cervical continuam surgindo, sendo este a segunda maior causa de morte por câncer entre mulheres de todo o mundo porque muitas não têm acesso a esta medida preventiva. O recente lançamento de uma vacina profilática contra o HPV deve reduzir o impacto da doença em longo prazo, no entanto os benefícios para as pessoas já infectadas pelo vírus são nulos, uma vez que a infecção por HPV geralmente acontece nas primeiras duas décadas da vida do indivíduo, mas o câncer cervical pode se manisfestar apenas vinte a trinta anos depois (BROWN et al., 2005).

O vírus HPV é capaz de infectar camadas basais do epitélio através de microlesões no tecido, mas o processo de malignização do tecido depende da integração do vírus ao genoma da célula hospedeira após quebra do genoma viral e

perda de alguns genes, principalmente E2. E2 tem a função de regular negativamente a expressão das oncoproteínas E6 e E7 e sua perda ocasiona a expressão contitutiva de E6/E7 (HOWLEY, 1991; MCCANCE, 1998; MCMURRAY et al., 2001). As proteínas E6 e E7 atuam na malignização celular através da interação com um vasto repertório de proteínas, promovendo bloqueio de apoptose, proliferação celular e instabilidade cromossômica. Especificamente E7, interage com a proteína retinoblastoma (pRb) liberando o fator de transcrição E2F, que ativa genes envolvidos na síntese de DNA e progressão do ciclo celular (DYSON et al., 1989; WERNESS; LEVINE; HOWLEY, 1990). E7 também pode promover proliferação celular através de interação com fatores de transcrição AP-1 (NEAD et al., 1998) e expressão de ciclina A e ciclina E (ZERFASS et al., 1995).

Mais de 120 tipos de HPV foram descritos e cerca de 40 apresentam tropismo para infectar a mucosa do trato anogenital (BOSCH et al., 1995; PAAVONEN, 2007). Os vírus com este tropismo podem ser classificados como “baixo” ou “alto risco” de acordo com seu potencial oncogênico. Os genótipos de baixo risco podem causar verrugas genitais e lesões benignas, sendo os mais prevalentes, os HPV-6 e HPV-11 (DE VILLIERS et al., 2004). Os genótipos do HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 e HPV-45 são os mais freqüentemente associados a lesões de alto grau e tumores malignos, pertencendo ao grupo dos genótipos de alto risco (MUNOZ et al., 2003). Os HPV-16 e HPV-18 destacam-se por serem responsáveis por cerca de 70% dos casos de câncer do colo do útero, sendo que o HPV-16 sozinho causa cerca de 55% dos casos deste tipo de câncer, podendo ser considerado o principal agente etiológico da doença (BOSCH et al., 1995).

As proteínas estruturais L1 e L2 formam o capsídeo viral e têm sido utilizadas como alvos para o desenvolvimento de vacinas profiláticas, sendo recentemente lançadas duas vacinas baseadas em VLPs constituídas por proteínas L1 do HPV-6, -11, -16 e 18 (Gardasil) ou L1 do HPV-16 e 18 (Cervarix) (HARPER et al., 2004, 2006; GARLAND et al., 2007). Por outro lado, as oncoproteínas E6 e E7 são utilizadas em diferentes abordagens terapêuticas, uma vez que a expressão constitutiva destas proteínas em células do carcinoma cervical e a participação na manutenção do estado maligno as tornam alvos ideais para intervenção terapêutica de tumores associadas ao HPV (DOEBERITZ et al., 1994).

Diferentes tipos de vacinas foram testadas para indução de resposta imune celular anti-tumor induzido por HPV-16, e a maioria dos estudos utilizou como

antígeno principal a proteína E7 e em menor extensão as proteínas E6, E5 e/ou E2 (LASARO; ERTL, 2009). As abordagens terapêuticas incluem formulações baseadas em peptídeos (FELTKAMP et al., 1993) ou na proteína E7 administrada com adjuvantes tais como citocinas, tais como a IL-12 (HARIHARAN et al., 1998; AHN et al., 2003), a fusão do antígeno protéico com proteínas de choque térmico (hsp 65) (CHU et al., 2000); vacinas de DNA (HUNG et al., 2001) e vetores virais baseados em adenovírus recombinantes (HE et al., 2000), vetores bacterianos vivos baseados em *L. monocitogenes* (GUNN et al., 2001) ou *Lactococcus lactis* recombinantes (BERMUDEZ-HUMARAN et al., 2003) e células dendríticas pulsadas com peptídeos imunodominantes da oncoproteína E7 (OKADA et al., 1997).

As proteínas E6 e E7 contêm regiões antigênicas apresentadas por moléculas de MHC/HLA classe I e II tanto em camundongos como em humanos (KANODIA, 2008). As respostas imunes envolvidas na erradicação de células tumorais são essencialmente mediadas por células T $CD8^+$. No entanto, uma atividade efetiva e sustentada de linfócitos T $CD8^+$ pode ser estimulada por colaboração de células T $CD4^+$ Th1. A indução de uma resposta citotóxica eficiente e a superação dos mecanismos de tolerância induzidos pelas proteínas E6 e E7 está entre os principais desafios encontrados para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra tumores induzidos por HPV. Devido à importância para o controle de tumores induzidos por HPV, E7 foi escolhida como antígeno modelo para a avaliação do potencial adjuvante de flagelina de *Salmonella* no contexto da ativação de linfóticos T $CD8^+$.

1.3.3 Paracoccidioidomicose (PCM) e o P. brasiliensis

A PCM é uma micose sistêmica de natureza granulomatosa e evolução crônica causada pelo fungo termodimórfico *P. brasiliensis* (Pb) (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; RESTREPO; MCEWEN; CASTANEDA, 2001; SAN-BLAS; NINO-VEJA; ITURRIAGA, 2002). A prevalência da doença é delimitada aos países da América latina, sendo que a maioria dos casos ocorre no Brasil, Venezuela, Colômbia, Equador e Argentina. No Brasil, a maior incidência da doença ocorre em áreas rurais dos estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás, Rio de Janeiro e Rondônia (AMEEN; TALHARI; TALHARI, 2010; COLOMBO et al., 2011). Acredita-se que aproximadamente 10 milhões de pessoas que vivem

em áreas endêmicas podem ter adquirido o fungo e dessas (BRUMMER et al., 1993; BORGES-WALMSLEY et al., 2002). A infecção por Pb geralmente acontece nas primeiras duas décadas da vida do indivíduo, mas a doença pode se manisfestar após o período de latência de cerca de quinze anos (COLOMBO et al., 2011; AMEEN; TALHARI; TALHARI, 2010).

O ciclo da PCM inicia-se quando conídios ou propágulos produzidos por micélios saprófitas no meio ambiente são inalados e instalam-se nos pulmões onde formam um granuloma primário, a partir do qual podem disseminar-se para órgãos como o baço e o fígado. Esse complexo primário pode evoluir para a cura, tornar-se latente ou ainda progredir causando uma doença severa e disseminada (SAN-BLAS; NINO-VEJA; ITURRIAGA, 2002; MENDES-GIANNINI et al., 2008).

A PCM tem múltiplas apresentações clínicas, com manifestações que podem variar de cutâneas a sistêmicas sendo classificada, para fins de diagnóstico, em duas formas clínicas bem distintas: aguda e crônica. A forma aguda da PCM representa 5% dos casos da doença e acomete indivíduos jovens. Essa forma é caracterizada por evolução rápida, baixa resposta imune celular e aumento na produção de anticorpos específicos. A forma crônica representa a forma mais grave da doença, onde se destacam mais de 90% dos casos, sendo observada principalmente em adultos do sexo masculino. Nessa fase a doença progride lentamente, com a presença do patógeno nas lesões, títulos elevados de anticorpos específicos e comprometimento da imunidade mediada por células. Nesses casos, 90% dos indivíduos apresentam manifestações pulmonares sendo que em apenas 25% dos indivíduos infectados a lesão permanece localizada no pulmão (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; BERNARD, 2008).

O tratamento medicamentoso da PCM é realizado a base de sulfametoxazol/trimetoprim, anfotericina B e derivados azólicos. Por ser uma doença crônica, seu tratamento é prolongado provocando complicações em vários órgãos em função dos efeitos adversos da terapia (AMEEN; TALHARI; TALHARI, 2010). O desenvolvimento de vacinas com potencial para estimular respostas imunológicas protetoras em pacientes crônicos representa uma melhoria na qualidade de vida desses indivíduos e podem ser utilizadas em abordagens profiláticas, terapêuticas ou ainda em associação com antifúngicos.

O controle da infecção depende de resposta imune celular efetiva, geralmente associada ao padrão tipo 1 (Th1) da resposta imunológica, caracterizado

pela síntese de citocinas que ativam macrófagos e linfócitos T $CD4^+$, resultando na formação de granulomas compactos. Indivíduos infectados e com a forma grave da doença param de apresentar resposta do tipo Th1 evoluindo com a resposta do tipo Th2 onde ocorre ativação de linfócitos B e produção de altos títulos de anticorpos (CANO et al., 1995; CALICH; KASHINO, 1998; CANO et al., 1998; ARRUDA et al., 2002).

Nos últimos anos, pesquisas voltadas para o desenvolvimento de uma vacina contra a PCM demonstraram que uma pequena seqüência de 15 aminoácidos, denominada P10, pertencente a glicoproteína de 43 kDa (gp43), define um epítopo específico para células T $CD4^+$ (TABORDA et al., 1998). Além disso, camundongos imunizados via parenteral com P10 em combinação com adjuvante completo de Freund (CFA) controlaram parcialmente a proliferação do Pb após desafio intratraqueal, e além disso, esses animais desenvolveram infecção 200 vezes menos intensa que os animais não imunizados. Ao analisar a sub-população de linfócitos T $CD4^+$ envolvidos, constatou-se que as células presentes eram do tipo Th1 e produtoras de IL-12 e IFN-ɣ. Em 2006 o grupo demonstrou ainda que a formulação P10/CFA empregado em associação a drogas antifúngicas de uso clínico, apresentou efeito aditivo levando à maior redução da carga fúngica nos animais infectados com Pb. A proteção mediada por P10 foi reproduzida em um modelo de recidiva da doença onde o tratamento com P10 em associação aos antifúngicos sulfametoxazol/trimetoprim impediu a exacerbação da infecção (MARQUES et al., 2006). A associação do P10/CFA com drogas antifúngicas também mostrou-se efetiva na redução da carga fúngica e na reativação do sistema imune celular em camundongos previamente tratados com dexametasona para mimetizar o estado anérgico ligado à forma aguda da PCM (MARQUES et al., 2008). No entanto, a administração do peptídeo P10 em combinação ao adjuvante de Freund inviabiliza a aplicação dessa formulação em seres humanos em função da elevada toxicidade do adjuvante.

Diante do exposto, os antígenos gp43 e P10 foram selecionados como antígenos-modelo para avaliação do potencial adjuvante de flagelinas de *Salmonella* no contexto da ativação de resposta imunológica, particularmente mediada por linfócitos T $CD4^+$.

1.2.4 Malária e o P. yoelli

A malária é uma doença crônica severa distribuída mundialmente. Em humanos, é causada por um dos quatro parasitas: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, sendo que este último não é encontrado no Brasil. Cerca de 40% da população mundial (2,4 bilhões de pessoas) está exposta à malária, especialmente pessoas que vivem em países tropicais e subtropicais. Nestas regiões, aproximadamente 300 a 500 milhões de novos casos são diagnosticados a cada ano, causando 1,5 a 2,7 milhões de mortes por ano, principalmente entre crianças na África (WHO, 2002). No Brasil, desde a década de 70, quando apenas 52.000 casos foram registrados, a incidência da doença aumentou gradualmente. Nos anos de 1999 e 2000 verificamos os maiores picos de incidência da doença, ultrapassando a faixa de 600.000 novos casos/ano, sendo 99% oriundos da região Amazônica. No ano de 2009 foram registrados quase 307 mil casos/ano em todo o Brasil, sendo esta a menor incidência da doença observada em um período de no mínimo 20 anos (BRASIL, 2011; JONES; HOFFMAN, 1994).

A ineficácia das estratégias de controle e tratamento da malária tem contribuído para o aumento da incidência da doença no mundo, e reforçam a necessidade de desenvolvimento de uma vacina terapêutica. Porém vários fatores impedem o desenvolvimento de uma vacina segura para a malária, dentre eles a complexidade do ciclo de vida do parasito e a ampla variedade de respostas imunológicas que devem ser induzidas (WATERS et al., 2005).

Estudos pioneiros realizados pelo grupo do Dr. Nussenzweig, demonstraram que imunidade protetora contra a malária pode ser induzida em animais e humanos por imunização com esporozoítas atenuados por radiação gama (NUSSENZWEIG; NUSSENZWEIG, 1986). Os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta protetora foram a produção de anticorpos e ativação de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ específicos para antígenos da superfície de esporozoítas (NUSSENZWEIG; NUSSENZWEIG, 1989; JONES; HOFFMAN, 1994). Desse modo, formas sanguíneas podem ser eliminadas pela ligação a anticorpos opsonizantes dirigidos para estruturas da superfície do patógeno, enquanto as formas intracelulares do parasita podem ser eliminadas por linfócitos T citotóxicos. Estas células são capazes de reconhecer epítopos derivados do parasita que são expressos por células infectadas em associação a moléculas MHC-I e promover a destruição dessas

células, impedindo a continuidade do ciclo celular do parasita (KAPPE; BUSCAGLIA; NUSSENZWEIG, 2004).

O papel de linfócitos T $CD8^+$ citotóxicos na imunidade à malária foi reforçado pela demonstração de que a transferência passiva de células T $CD8^+$ CS-específicas para camundongos virgens foi capaz de protegê-los contra o desafio com *P. berghei* e *P. yoelii,* agentes da malária em murinos (RODRIGUES et al., 1991; TSUJI; ZAVALA, 2003). Assim, o desenvolvimento de imunidade mediada por células T citotóxicas representa prioridade para o desenvolvimento de uma vacina com propriedades profiláticas e terapêuticas contra a malária.

Pesquisas de alvos antigênicos para vacinas contra a malária com potencial para ativação de linfócitos T $CD8^+$ citotóxicos voltaram-se para uma proteína de superfície com estrutura primária definida, a proteína circunsporozoíta (CS). Esta proteína é encontrada em grande quantidade na superfície de esporozoítos de todas as espécies de *Plasmodium* e possui papel central na invasão de hepatócitos (KAPPE; BUSCAGLIA; NUSSENZWEIG, 2004). Linfócitos T $CD8^+$ extraídos de camundongos imunizados com esporozoítas atenuados por radiação foram específicos para um único epítopo encontrado na região C- terminal da proteína CS de *P. yoelii* e *P. berghei* (ROMERO et al., 1989; RODRIGUES et al., 1991). Este epítopo, representado pela seqüência de aminoácidos SYVPSAEQI, é reconhecido por linfócitos T $CD8^+$ restritos para o MHC H-2 K^d e seu papel na proteção à malária murina foi confirmado em diversos estudos, o que impulsionou o desenvolvimento de vacinas baseadas no antígeno CS (WEISS et al., 1988; ROMERO et al., 1989; GONZALEZ-ASEGUINOLAZA et al., 2003). Em voluntários imunizados com esporozoítas de *P. falciparum,* atenuados por radiação, foi demonstrado a presença de linfócitos T $CD8^+$ CS-reativos, indicando que a proteína CS é uma forte candidata para a elaboração de vacinas contra a malária em humanos.

Diferentes veículos vacinais foram empregados na ativação de células T $CD8^+$ específicas para o epitopo da proteína CS em camundongos. Tais abordagens incluiram vetores vacinais vivos, como vírus e bactérias recombinantes, vacinas de DNA, partículas semelhantes a vírus (VLP) e peptídeos sintéticos. Os vetores virais utilizados para ativar células T $CD8^+$ específicas ao epitopo CS, de um modo geral, conferiram diferentes graus de imunidade protetora contra esporozoítas do *P. yoelii* (SOARES; RODRIGUES, 1998). No entanto, a combinação de dois vetores virais expressando a proteína CS demonstrou ser superior a formulações vacinais

baseadas apenas em um tipo de vírus (LI et al., 1993; GONZALEZ-ASEGUINOLAZA et al., 2003). Outros estudos baseados em vacinas de DNA contendo o gene inteiro da proteína CS seguido por uma dose de reforço com vetor viral codificando o epitopo CS relataram aumento significativo na indução de respostas mediadas por células T $CD8^+$-específicas (SEDEGAH et al., 1998; SEDEGAH et al., 2000).

Devido a importância de células T $CD8^+$ CS-específicas para o controle da malária estágio pré-eritrocítico, CS foi escolhido como antígeno modelo para a avaliação do potencial adjuvante de flagelina de *Salmonella* no contexto da ativação de linfóticos T $CD8^+$.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ênfase histórica na resposta imunológica humoral como mecanismo requerido para proteção de doenças infecciosas tem levado ao desenvolvimento de vacinas com habilidade para aumentar a produção de anticorpos. Como conseqüência, muitos adjuvantes comumente utilizados são efetivos para elevar os títulos de anticorpos séricos, mas não promovem significante ativação de respostas celulares. A capacidade de um adjuvante para afetar qualitativamente o resultado da resposta imunológica adaptativa por modular o padrão de citocinas Th1/Th2 ou promover ativação de CTLs é um aspecto importante que deve ser considerado devido a necessidade de vacinas contra doenças infecciosas tais como, malária, Chagas, AIDS, hepatite C (HCV) e câncer, entre outras. Essas doenças são causadas por patógenos que apresentam grande variação antigênica, diferentes formas e reservatórios celulares, requerendo, muitas vezes o emprego de diferentes antígenos e estratégias vacinais para promover proteção. Essas necessidades têm modificado o foco do desenvolvimento de vacinas para a geração de ampla resposta imunológica humoral e celular, sendo a especificidade do adjuvante e o conhecimento de seus mecanismos de adjuvanticidade pontos determinantes para a efetividade das vacinas.

Nosso conhecimento sobre a imunobiologia das células reguladoras, células apresentadoras de antígenos, importância da resposta mediada por linfócitos T e a contribuição de alguns mecanismos imunológicos para a resolução de determinadas patologias fornece um referêncial contínuo para otimização de futuras vacinas. Nesse contexto, a adequada ativação de células T tornou-se um marco importante para o desenvolvimento de novas vacinas e muitos adjuvantes estão sendo testados em ensaios pré-clínicos e clínicos com esse objetivo. No entanto, o nível de complexidade requerido para ativação de células T, principalmente linfócitos T $CD8^+$, implica em muitos desafios, os quais iniciam com a escolha do antígeno, mas englobam desde a composição da formulação vacinal, forma de administração, esquema de imunização, população alvo e avaliação da resposta de CTL, dentre outros aspectos. A utilização de imunomoduladores capazes de promover ativação dessa população celular oferece a oportunidade para contornarr alguns destes problemas e obter sucesso.

Flagelinas bacterianas, especialmente aquelas produzidas por espécies de *S. enterica*, representam uma classe promissora de adjuvantes vacinais conforme demonstrado em inúmeros trabalhos descritos nestes quase 20 anos de estudos. Flagelina também exibe inúmeras vantagens para uso em humanos, as quais recentemente foram confirmadas em cinco ensaios clínicos (www.clinicaltrials.gov). No entanto, a maioria dos trabalhos empregou flagelina de *Salmonella* em formulações vacinais destinadas à ativação de linfócitos B ou T $CD4^+$, de modo que o papel desse adjuvante para ativação de linfócitos T $CD8^+$ permanece obscuro, com apenas meia dúzia de trabalhos publicados nos últimos 8 anos que investigaram tal aspecto.

Este trabalho representa um compêndio de várias abordagens vacinais utilizadas para avaliar o potencial adjuvante de flagelinas de *Salmonella* no contexto da ativação de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ realizadas pela pesquisadora em 7 anos de estudo. As abordagens utilizadas para avaliação do potencial adjuvante da flagelina consistiram no emprego de vacinas de primeira geração- baseadas na utilização de linhagens vacinais de *Salmonella* que expressam flagelos quiméricos produzidos a partir da fusão do antígeno à flagelina; vacinas de subunidades- onde a flagelina foi utilizada na forma de proteína de fusão ou co-administrada com antígenos protéicos ou peptídicos; e por fim, vacinas de terceira geração- onde a informação genética codificando para flagelina e/ou antígeno foram entregues na forma de DNA plasmidiano. Além disso, foram utilizados antígenos de origem fúngica, parasitária, viral e tumoral que foram administrados por vias de mucosa e parenteral, sendo, portanto, uma referência dos vários aspectos da complexa reposta imunológica desencadeada por esse adjuvante.

Nossa experiência com o uso de flagelinas de *Salmonella* como adjuvante vacinal nos permite listar algumas conclusões principais. (i) flagelina é um potente adjuvante para a ativação de respostas imunológicas humorais, e para esse fim, não há necessidade de fusão ao antígeno heterólogo ou incorporação em sistemas de entrega de antígenos; (ii) a resposta imunológica desencadeada pela flagelina (nas doses de 1-15 µg) é do tipo mixta com predominância do padrão Th2, independentemente da via utilizada; (iii) alguns adjuvantes TLR-dependente ou TLR-independente podem ser administrados junto com a flagelina para modular a resposta imunológica para o padrão Th1; (iv) flagelina exerce efeito adjuvante por inúmeros mecanismos, dentre eles, ativação de APCs, produção de citocinas pró-

inflamatórias e direcionamento do antígeno a APCs quando na forma de proteína de fusão; (v) os efeitos imunológicos da inoculação de flagelina são em geral, discretos, o que a torna um adjuvante seguro para uso em humanos; (vi) os mecanismos de adjuvanticidade da flagelina não são exclusidos de sua ligação ao receptor TLR5, mas podem decorrer de efeitos sobre a ativação de receptores IPAF/Naip5 uma vez que verificamos proteção terapêutica em animais TLR5$^{-/-}$ desafiados com células TC-1; (vii) a utilização de flagelina na forma fusionada ao antígeno é mais eficiente para ativação de linfócitos T CD8^{+} do que a forma co-administrada; (viii) o uso de flagelina como adjuvante para vacinas anti-câncer é controverso pois revela que não existe uma única resposta imunológica ou susceptibilidade de diferentes tumores ao estímulo com flagelina.

Os resultados obtidos demonstram que a flagelina na forma de proteína purificada é capaz promover ativação de células T CD8^{+} antígeno-específica, mas que esta ativação é discreta e provavelmente incapaz de mediar proteção contra patógenos intracelulares ou células tumorais que requerem potente resposta de CTLs. No entanto, os resultados obtidos abrem perspectivas para que este adjuvante possa ser utilizado para tal finalidade desde que algumas modificações sejam realizadas de modo a acentuar suas propriedades adjuvantes, como por exemplo, a fusão genética ao antígeno; a utilização da informação genética (vacinas de DNA); ou a incorporação em sistemas de entrega de antígenos tais como nanopartículas que têm demonstrado efetividade da flagelina para ativação de CTL; ou ainda, a co-administração de outros adjuvantes capazes de modular a resposta da flagelina beneficiando a geração de linfócitos Th1.

No futuro, com a compreensão mais profunda dos mecanismos pelos quais a flagelina promove ativação de respostas celulares, incluindo o papel da ativação de TLR5 em células tumorais e a contribuição da via de sinalização mediada por IPAF/Naip5 para o efeito adjuvante da flagelina, poderemos utilizar este adjuvante para compor formulações vacinais contra doenças virais, bacterianas e as primeiras vacinas contra doenças fúngicas e parasitárias humanas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS[1]

AHN, W. S.; BAE, S. M.; KIM, T. Y.; KIM, T. G.; LEE J. M.; NAMKOONG S.E.; KIM, C.K.; SIN, J.I.. A therapy modality using recombinant IL-12 adenovirus plus E7 protein in a human papillomavirus 16 E6/E7-associated cervical cancer animal model. **Hum. Gene Ther.**, v. 14, n. 15, p. 1389-1399, 2003.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 7, p. 499-511, 2004.

AKIRA, S.; YAMAMOTO, M.; TAKEDA, K. Role of adapters in Toll-like receptor signalling. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 31, n. 3, p. 637-642, 2003.

AMEEN, M.; TALHARI, C.; TALHARI, S. Advances in paracoccidioidomycosis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 35, n. 6, p. 576-850, 2010.

ANDERSEN-NISSEN, E.; SMITH, K. D.; BONNEAU, R.; STRONG, R. K.; ADEREM, A. A conserved surface on Toll-like receptor 5 recognizes bacterial flagellin. **J. Exp. Med.**, v. 204, n. 2, p. 393-403, 2007.

APPLEQUIST, S. E.; ROLLMAN, E.; WAREING, M. D.; LIDEN, M.; ROZELL, B.; HINKULA, J.; LJUNGGREN, H. G. Activation of innate immunity, inflammation, and potentiation of DNA vaccination through mammalian expression of the TLR5 agonist flagellin. **J. Immunol.**, v. 175, n. 6, p. 3882-3891, 2005.

ARMSTRONG, D. J.; ROMAN, A. The anomalous electrophoretic behavior of the human papillomavirus type 16 E7 protein is due to the high content of acidic amino acid residues. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 192, n. 3, p. 1380-1387, 1993.

ARRUDA, C.; FRANCO, M. F.; KASHINO, S. S.; NASCIMENTO, F. R.; FAZIOLI, A.; VAZ, C. A.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by Paracoccidioides brasiliensis but enhances pulmonary inflammation. **Clin. Immunol.**, v. 103, n. 2, p. 185-195, 2002.

AUTRAN, B.; CARCELAIN, G.; COMBADIERE, B.; DEBRE, P. Therapeutic vaccines for chronic infections. **Science**, v. 305, n. 5681, p. 205-208, 2004a.

AUTRAN, B.; COSTAGLIOLA, D.; MURPHY, R.; KATLAMA, C. Evaluating therapeutic vaccines in patients infected with HIV. **Expert. Rev. Vaccines**, v. 3, n. 4, p. 169-177, 2004b.

---

[1] De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BALDRIDGE, J. R.; MCGOWAN, P.; EVANS, J. T.; CLUFF, C.; MOSSMAN, S.; JOHNSON, D.; PERSING, D. Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. **Expert. Opin. Biol. Ther.**, v. 4, n. 7, p. 1129-1138, 2004.

BARBER, D. L.; WHERRY, E. J.; AHMED, R. Cutting edge: rapid in vivo killing by memory CD8 T cells. **J. Immunol.**, v. 171, n. 1, p. 27-31, 2003.

BARGIERI, D. Y.; LEITE, J. A.; LOPES, S. C.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; BRAGA, C. J. M.; FERREIRA, L. C.; SOARES, I. S.; COSTA, F. T.; RODRIGUES, M. M.. Immunogenic properties of a recombinant fusion protein containing the C-terminal 19 kDa of Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 and the innate immunity agonist FliC flagellin of Salmonella typhimurium. **Vaccine**, v. 28, n. 16, p. 2818-2826, 2010.

BARGIERI, D. Y.; ROSA, D. S.; BRAGA, C. J. M.; CARVALHO, B. O.; COSTA, F. T.; ESPINDOLA, N. M.; VAZ, A. J.; SOARES, I. S.; FERREIRA, L. C.; RODRIGUES, M. M. New malaria vaccine candidates based on the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist Salmonella Typhimurium FliC flagellin. **Vaccine**, v. 26, n. 48, p. 6132-6142, 2008.

BATES, J. T.; GRAFF, A. H.; PHIPPS, J. P.; GRAYSON, J. M.; MIZEL, S. B. Enhanced antigen processing of flagellin fusion proteins promotes the antigen-specific CD8+ T cell response independently of TLR5 and MyD88. **J. Immunol.**, v. 186, n. 11, p .6255-6262, 2011.

BEN-YEDIDIA, T.; MARCUS, H.; REISNER, Y.; ARNON, R. Intranasal administration of peptide vaccine protects human/mouse radiation chimera from influenza infection. **Int. Immunol.**, v. 11, n. 7, p. 1043-1051, 1999a.

BEN-YEDIDIA, T.; TARRAB-HAZDAI, R.; SCHECHTMAN, D.; ARNON, R. Intranasal administration of synthetic recombinant peptide-based vaccine protects mice from infection by Schistosoma mansoni. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 9, p. 4360-4366, 1999b.

BERMUDEZ-HUMARAN, L. G.; CORTES-PEREZ, N. G. ; LE LOIR, Y.; GRUSS, A.; RODRIGUEZ-PADILLA, C.; SAUCEDO-CARDENAS, O.; LANGELLA, P.; DE OCA-LUNA, R. Fusion to a carrier protein and a synthetic propeptide enhances E7 HPV-16 production and secretion in Lactococcus lactis. **Biotechnol. Prog.,** v. 19, n. 3, p. 1101-1104, 2003.

BERNARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidiodomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 209-221, 2008.

BOLESTA, E.; GZYL, J.; WIERZBICKI, A.; KMIECIAK, D.; KOWALCZYK, A.; KANEKO, Y.; SRINIVASAN, A.; KOZBOR, D. Clustered epitopes within the Gag-Pol fusion protein DNA vaccine enhance immune responses and protection against

challenge with recombinant vaccinia viruses expressing HIV-1 Gag and Pol antigens. **Virology**, v. 332, n. 2, p. 467-479, 2005.

BORGES-WALMSLEY, M. I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A. R. The pathobiology of Paracoccidioides brasiliensis. **Trends Microbiol**., v. 10, n. 2, p. 80-87, 2002.

BORROW, P.; LEWICKI, H.; HAHN, B. H.; SHAW, G. M.; OLDSTONE, M. B. Virus-specific $CD8^+$ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. **J. Virol.**, v. 68, n. 9, p. 6103-6110, 1994.

BOSCARDIN, S. B.; HAFALLA, J. C.; MASILAMANI, R. F.; KAMPHORST, A. O.; ZEBROSKI, H. A.; RAI, U.; MORROT, A.; ZAVALA, F.; STEINMAN, R. M.; NUSSENZWEIG, R. S.; NUSSENZWEIG, M. C. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. **J. Exp. Med.**, v. 203, n. 3, p. 599-606, 2006.

BOSCH, F. X.; MANOS, M. M.; MUNOZ, N.; SHERMAN, M.; JANSEN, A. M.; PETO, J.; SCHIFFMAN, M. H.; MORENO, V.; KURMAN, R.; SHAH, K. V. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 87, n. 11, p .796-802, 1995.

BRAGA, C. J. M.; MASSIS, L. M.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; ALENCAR, B. C.; BARGIERI, D. Y.; BOSCARDIN, S. B.; RODRIGUES, M. M.; FERREIRA, L. C. $CD8^+$ T cell adjuvant effects of Salmonella FliCd flagellin in live vaccine vectors or as purified protein. **Vaccine**, v. 28, n. 5, p. 1373-1382. 2010.

BRAGA, C. J. M., RITTNER, G. M.; MUNOZ-HENAO, J. E.; TEIXEIRA, A. F.; MASSIS, L. M.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; TABORDA, C. P.; TRAVASSOS, L. R.; FERREIRA, L. C. Paracoccidioides brasiliensis vaccine formulations based on the gp43-derived P10 sequence and the Salmonella enterica FliC flagellin. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 4, p. 1700-1707, 2009.

BRAGA, C. J. M.; MASSIS, L. M.; ALENCAR, B. C. G.; MAURÍCIO, M. R.; SBRGOGIO-ALMEIDA. M. E.; FERREIRA, L. C. S. Cytotoxic T Cell Adjuvant Effects of Three Salmonella enteric flagellin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 44-49, 2008.

BRASIL (2011). Casos confirmados de Malária. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2009* (dados referentes a notificações realizadas até o mês de dezembro). Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Casos_confirmados_malaria_90a09_serie_historica.pdf. [17 agosto de 2011]

BROWN, D. R.; SHEW, M. L.; QADADRI, B.; NEPTUNE, N.; VARGAS, M.; TU, W.; JULIAR, B. E.; BREEN, T. E.; FORTENBERRY, J. D. A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. **J. Infect. Dis.**, v. 191, n. 2, p. 182-192, 2005.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v .6, n. 2, p. 89-117, 1993.

CAI, Z.; SANCHEZ, A.; SHI, Z.; ZHANG, T.; LIU, M.; ZHANG, D. Activation of Toll-like receptor 5 on breast cancer cells by flagellin suppresses cell proliferation and tumor growth. **Cancer Res**., v. 71, n. 7, p. 2466-2475, 2011.

CALICH, V. L.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of Paracoccidioides brasiliensis infection. **Braz. J. Med. Biol. Res**., v. 31, n. 5, p. 615-623, 1998.

CANO, L. E.; KASHINO, S. S.; ARRUDA, C.; ANDRE, D.; XIDIEH, C. F.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A.; BURGER, E.; CALICH, V. L. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 2, p. 800-806, 1998.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 5, p. 1777-1783, 1995.

CHANG, Y. C.; MADKAN, V.; COOK-NORRIS, R.; SRA, K.; TYRING, S. Current and potential uses of imiquimod. **South Med. J.**, v. 98, n. 9, p. 914-920, 2005.

CHU, N. R.; WU, H. B.; WU, T.; BOUX, L. J.; SIEGEL, M. I.; MIZZEN, L. A. Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumour by administration of fusion protein comprising Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin (BCG) hsp65 and HPV16 E7. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 121, n. 2, p. 216-225, 2000.

CHUNG, N. P.; CHEN, Y.; CHAN, V. S.; TAM, P. K.; LIN, C. L. Dendritic cells: sentinels against pathogens. **Histol. Histopathol.**, v. 19, n. 1, p. 317-324, 2004.

CID-ARREGUI, A.; JUAREZ, V.; ZUR-HAUSEN, H. A synthetic E7 gene of human papillomavirus type 16 that yields enhanced expression of the protein in mammalian cells and is useful for DNA immunization studies. **J. Virol.**, v. 77, n. 8, p. 4928-4937, 2003.

COLOMBO, A. L.; TOBON, A.; RESTREPO, A.; QUEIROZ-TELLES, F.; NUCCI, M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Med. Mycol.**, v. 2, p. 23-26, 2011.

CRELLIN, N. K.; GARCIA, R. V.; HADISFAR, O.; ALLAN, S. E.; STEINER, T. S.; LEVINGS, M. K.. Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. **J. Immunol.**, v. 175, n. 12, p. 8051-8059, 2005.

CUADROS, C.; LOPEZ-HERNANDEZ, F. J.; DOMINGUEZ, A. L.; M. MCCLELLAND, M.; LUSTGARTEN, J. Flagellin fusion proteins as adjuvants or vaccines induce specific immune responses. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 5, p. 2810-2816, 2004.

CULIG, Z. Cytokine disbalance in commun human cancers. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1813, n. 2, p. 308-314, 2011.

CUNNINGHAM, A. F.; KHAN, M.; BALL, J.; TOELLNER, K. M.; SERRE, K.; MOHR, E.; MACLENNAN, I. C. Responses to the soluble flagellar protein FliC are Th2, while those to FliC on Salmonella are Th1. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, n. 11, p. 2986-2995, 2004.

DE GREGORIO, E.; TRITTO, E.; RAPPUOLI, R. Alum adjuvanticity: unraveling a century old mystery. **Eur. J. Immunol.**, v. 38, n. 8, p. 2068-2071, 2008.

DE VILLIERS, E. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H. U.; ZUR, H. HAUSEN. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

DIDIERLAURENT, A.; FERRERO, I.; OTTEN, L. A.; DUBOIS, B.; REINHARDT, M.; CARLSEN, H.; BLOMHOFF, R.; AKIRA, S.; KRAEHENBUHL, J. P.; SIRARD, J. C. Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. **J. Immunol.**, v. 172, n. 11, p. 6922-6930, 2004.

DINIZ, M. O. **Avaliação da resposta imunológica e protetora de uma vacina de DNA contra tumores induzidos por HPV-16.** 2010. 171 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

DINIZ, M. O.; LASARO, M. O.; ERTL, H. C.; FERREIRA, L. C. Immune responses and therapeutic antitumor effects of an experimental DNA vaccine encoding human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to herpesvirus glycoprotein D. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 17, n. 10, p. 1576-1583, 2010.

DITTMER, U.; OLBRICH, A. R. Treatment of infectious diseases with immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 6, n. 5, p. 472-477, 2003.

DUPUIS, M.; DENIS-MIZE, K.; LABARBARA, A.; PETERS, W.; CHARO, I. F.; MCDONALD, D. M.; OTT, G. Immunization with the adjuvant MF59 induces macrophage trafficking and apoptosis. **Eur. J. Immunol.**, v.31, n.10, p. 2910-2918, 2001.

DYSON, N.; HOWLEY, P. M.; MUNGER, K.; HARLOW, E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, v. 243, n. 4893, p. 934-937, 1989.

FAHAM, A.; ALTIN, J. G. Antigen-containing liposomes engrafted with flagellin-related peptides are effective vaccines that can induce potent antitumor immunity and immunotherapeutic effect. **J. Immunol.**, v. 185, n. 3, p. 1744-1754, 2010.

FELTKAMP, M. C.; SMITS, H. L.; VIERBOOM, M. P.; MINNAAR, R. P.; DE JONGH, B. M.; DRIJFHOUT, J. W.; TER SCHEGGET, J.; MELIEF, C. J.; KAST, W. M. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, n. 9, p. 2242-2249, 1993.

FLYNN, J. L.; WEISS, W. R.; NORRIS, K. A.; SEIFERT, H. S.; KUMAR, S.; SO, M. Generation of a cytotoxic T-lymphocyte response using a Salmonella antigen-delivery system. **Mol. Microbiol.**, v. 4, n. 12, p. 2111-2118, 1990.

FU, J. L.; XU, D. P.; ZHAO, P.; CHEN, L. M.; ZHANG, H.; ZHOU, C. B.; YAO, J. X. RONG, Y. H.; WANG., F. S. The characterization of regulatory T cells in peripheral blood of HBV-infected patients. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 86, n. 22, p. 1522-1525. 2006.

GAHERY-SEGARD, H.; PIALOUX, G.; FIGUEIREDO, S.; IGEA, C.; SURENAUD, M.; GASTON, J.; GRAS-MASSE, H.; LEVY; J. P.; GUILLET, J. G. Long-term specific immune responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide vaccine: characterization of CD8+-T-cell epitopes recognized. **J. Virol.**, v. 77, n. 20, p.11220-11231, 2003.

GARLAND, S. M.; STEBEN, M.; HERNANDEZ-AVILA, M.; KOUTSKY, L. A.; WHEELER, C. M.; PEREZ, G.; HARPER, D. M.; LEODOLTER, S.; TANG, G. W.; FERRIS, D. G.; ESSER, M. T.; VUOCOLO, S. C.; NELSON, M.; RAILKAR, R.; SATTLER, C.; BARR, E. Noninferiority of antibody response to human papillomavirus type 16 in subjects vaccinated with monovalent and quadrivalent L1 virus-like particle vaccines. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, n. 6, p. 792-795, 2007.

GIUDICE, G. D. E. F.; BUGARINI, R.; HORA, M.; HENRIKSSON, T.; PALLA, E.; O'HAGAN, D.; DONNELLY, J.; RAPPUOLI, R.; PODDA, A. Vaccines with the MF59 Adjuvant Do Not Stimulate Antibody Responses against Squalene **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 9, p. 1010-1014, 2006.

GOLDSTONE, S. E.; PALEFSKY, J. M.; WINNETT, M. T.; NEEFE, J. R. Activity of HspE7, a novel immunotherapy, in patients with anogenital warts. **Dis. Colon Rectum.**, v. 45, n. 4, p. 502-507, 2002.

GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G.; NAKAYA, Y.; MOLANO, A.; DY, E.; ESTEBAN, M.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J. R.; PALESE, P.; GARCIA-SASTRE, A.; NUSSENZWEIG, R. S. Induction of protective immunity against malaria by priming-boosting immunization with recombinant cold-adapted influenza and modified vaccinia Ankara viruses expressing a CD8+-T-cell epitope derived from the circumsporozoite protein of Plasmodium yoelii. **J. Virol.**, v. 77, n. 21, p. 11859-1166, 2003.

GUDMUNDSDOTTER, L.; BERNASCONI, D.; HEJDEMAN, B.; SANDSTROM, E.; ALAEUS, A.; LIDMAN, K.; ENSOLI, B.; WAHREN, B.; BUTTO, S. Cross-clade immune responses to Gag p24 in patients infected with different HIV-1 subtypes and correlation with HLA class I and II alleles. **Vaccine**, v. 26, n. 40, p. 5182-5187, 2008.

GUNN, G. R.; ZUBAIR, A.; PETERS, C.; PAN, Z. K.; WU, T. C.; PATERSON, Y. Two Listeria monocytogenes vaccine vectors that express different molecular forms of human papilloma virus-16 (HPV-16) E7 induce qualitatively different T cell immunity that correlates with their ability to induce regression of established tumors immortalized by HPV-16. **J. Immunol.**, v. 167, n. 11, p. 6471-6479, 2001.

HARIHARAN, K.; BRASLAWSKY, G.; BARNETT, R. S.; BERQUIST, L. G.; HUYNH, T.; HANNA, N.; BLACK, A. Tumor regression in mice following vaccination with human papillomavirus E7 recombinant protein in PROVAX. **Int. J. Oncol.**, v. 12, n. 6, p. 1229-1235, 1998.

HARPER, D. M.; FRANCO, E. L.; WHEELER, C.; FERRIS, D. G.; JENKINS, D.; SCHUIND, A.; ZAHAF, T.; INNIS, B.; NAUD, P.; DE CARVALHO, N. S.; ROTELI-MARTINS, C. M.; TEIXEIRA, J.; BLATTER, M. M.; KORN, A. P.; QUINT, W.; DUBIN, G. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 364, n. 9447, p. 1757-1765, 2004.

HARPER, D. M.; FRANCO, E. L.; WHEELER, C. M.; MOSCICKI, .A. B.; ROMANOWSKI, B.; ROTELI-MARTINS, C. M.; JENKINS, D.; SCHUIND, A.; COSTA CLEMENS S. A.; DUBIN, G. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. **Lancet**, v. 367, n. 9518, p. 1247-1255, 2006.

HE, Z.; WLAZLO, A. P.; KOWALCZYK, D. W.; CHENG, J.; XIANG, Z. Q.; GILES-DAVIS, W.; ERTL, H. C. Viral recombinant vaccines to the E6 and E7 antigens of HPV-16. **Virology**, v. 270, n. 1, p. 146-161, 2000.

HONKO, A. N.; MIZEL, S. B. Effects of flagellin on innate and adaptive immunity. **Immunol. Res.**, v. 33, n. 1, p. 83-101, 2005.

HONKO, A. N.; SRIRANGANATHAN, N.; LEES; C. J.; MIZEL, S. B. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with Yersinia pestis. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 2, p. 1113-1120, 2006.

HOWLEY, P. M. Role of the human papillomaviruses in human cancer. **Cancer Res**., v. 51, p. 5019-5022, 1991. Suppl. 18.

HUANG, B.; ZHAO, J.; UNKELESS, J. C.; FENG, Z. H.; XIONG, H. TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. **Oncogene**, v. 27, n. 2, p. 218-224, 2008.

HULEATT, J. W.; JACOBS, A. R.; TANG, J.; DESAI, P.; KOPP, E. B.; HUANG, Y.; SONG, L.; NAKAAR, V.; POWELL, T. J. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. **Vaccine**, v.25, n.4, p.763-775, 2007.

HULEATT, J. W.; NAKAAR, V.; DESAI, P.; HUANG, Y.; HEWITT, D.; JACOBS, A.; TANG, J.; MCDONALD, W.; SONG, L.; EVANS, R. K.; UMLAUF, S.; TUSSEY, L.; POWELL, T. J. Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. **Vaccine**, v. 26, n. 2, p. 201-214, 2008.

HUNG, C. F.; CHENG, W. F.; HSU, K. F.; CHAI, C. Y.; HE, L.; LING, M.; WU, T. C. Cancer immunotherapy using a DNA vaccine encoding the translocation domain of a bacterial toxin linked to a tumor antigen. **Cancer Res.**, v. 61, n. 9, p. 3698-3703, 2001.

JAHRSDORFER, B.; MUHLENHOFF, L.; BLACKWELL, S. E.; WAGNER, M.; POECK, H.; HARTMANN, E.; JOX, R.; GIESE, T.; EMMERICH, B.; ENDRES, S.; WEINER, G. J.; HARTMANN, G. B-cell lymphomas differ in their responsiveness to CpG oligodeoxynucleotides. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, n. 4, p. 1490-1499, 2005.

JAHRSDORFER, B.; WOOLDRIDGE, J. E.; BLACKWELL, S. E.; TAYLOR, C. M.; GRIFFITH, T. S.; LINK, B. K.; WEINER, G. J. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides induce apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia cells. **J. Leukoc. Biol.**, v. 77, n. 3, p. 378-387, 2005.

JEON, S. H.; BEN-YEDIDIA, T.; ARNON, R. Intranasal immunization with synthetic recombinant vaccine containing multiple epitopes of influenza virus. **Vaccine**, v. 20, n. 21-22, p. 2772-2780, 2002.

JONES, T. R.; HOFFMAN, S. L. Malaria vaccine development. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 7, n. 3, p. 303-310, 1994.

KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1589, n. 1, p. 1-13, 2002.

KANODIA, S.; FAHEY, L. M.; KAST, W. M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. Curr. Cancer Drug Targets, v.7, p. 79-89, 2007.

KANZLER, H.; BARRAT, F. J.; HESSEL E. M.; COFFMAN,R. L. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. **Nat. Med.**, v. 13, n. 5, p. 552-559, 2007.

KAPPE, S. H.; BUSCAGLIA, C. A.; NUSSENZWEIG, V. Plasmodium sporozoite molecular cell biology. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 20, p. 29-59, 2004.

KRIEG, A. M. Toll-free vaccines? **Nat. Biotechnol.**, v. 25, n. 3, p. 303-305, 2007.

KURTS, C.; ROBINSON, B. W.; KNOLLE, P. A. Cross-priming in health and disease. **Nat. Rev. Immu**nol., v. 10, n. 6, p. 403-414, 2010.

LAL, R. B.; CHAKRABARTI, S.; YANG, C. Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development. **Indian J. Med. Res.**, v. 121, n. 4, p. 287-314, 2005.

LASARO, M. O.; DINIZ, M. O.; REYES-SANDOVAL, A.; ERTL, H. C.; FERREIRA, L. C. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1. **Microbes Infect.**, v. 7, n. 15, p. 1541-1550, 2005.

LASARO, M. O. e H. C. ERTL. Potentiating vaccine immunogenicity by manipulating the HVEM/BTLA pathway and other co-stimulatory and co-inhibitory signals of the immune system. **Hum. Vaccin.**, v. 5, n. 1, p. 6-14, 2009.

LEE, C. M.; CHANG, P. P.; TSAI, S. C.; ADAMIK, R.; PRICE, S. R.; KUNZ, B. C.; MOSS, J.; TWIDDY, E. M.; HOLMES, R. K. Activation of Escherichia coli heat-labile enterotoxins by native and recombinant adenosine diphosphate-ribosylation factors, 20-kD guanine nucleotide-binding proteins. **J. Clin. Invest.**, v. 87, n. 5, p. 1780-1786, 1991.

LEE, S. E.; KIM, S. Y.; JEONG, B. C.; KIM, Y. R.; BAE, S. J.; AHN, O. S.; LEE, J. J.; SONG, H. C.; KIM, J. M.; CHOY, H. E.; CHUNG, S. S.; KWEON; M. N.; RHEE, J. H. A bacterial flagellin, Vibrio vulnificus FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 1, p. 694-702, 2006.

LETRAN, S. E.; LEE, S. J.; ATIF, S. M.; UEMATSU, S.; AKIRA, S., MCSORLEY, S. J. TLR5 functions as an endocytic receptor to enhance flagellin-specific adaptive immunity. **Eur. J. Immunol.**, v. 41, n. 1, p. 29-38, 2011.

LI, S.; RODRIGUES, M.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J. R.; ESTEBAN, M.; PALESE, P.; NUSSENZWEIG, R. S.; ZAVALA, F. Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 11, p. 5214-5218, 1993.

LIGHTFIELD, K. L.; PERSSON, J.; BRUBAKER, S. W.; WITTE, C. E.; VON MOLTKE, J.; DUNIPACE, E. A.; HENRY, T.; SUN, Y. H.; CADO, D.; DIETRICH, W. F.; MONACK, D. M.; TSOLIS, R. M.; VANCE, R. E. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. **Nat. Immunol.,** v. 9, n. 10, p. 1171-1178, 2008.

LIN, K. Y.; GUARNIERI, F. G.; STAVELEY-O'CARROLL, K. F.; LEVITSKY, H. I.; AUGUST, J. T.; PARDOLL, D. M.; WU, T. C. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. **Cancer Res.**, v. 56, n. 1, p. 21-26, 1996.

LUNA, M. G.; MARTINS, M. M.; NEWTON, S. M.; COSTA, S. O.; ALMEIDA, D. F.; FERREIRA, L. C. Cloning and expression of colonization factor antigen I (CFA/I) epitopes of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) in Salmonella flagellin. **Res. Microbiol.**, v. 148, n. 3, p. 217-228, 1997.

LYCKE, N. Is the choice of vaccine adjuvant critical for long-term memory development? **Expert. Rev. Vaccines**, v. 9, n. 12, p. 1357-1361, 2010.

MARQUES, A. F.; DA SILVA, M. B.; JULIANO, M. A.; MUNHOZ, J. E.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeasts of Paracoccidioides brasiliensis. **Microbes Infect.**, v. 10, n. 12-13, p. 1251-1258, 2008.

MARQUES, A. F.; DA SILVA, M. B.; JULIANO, M. A.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of Paracoccidioides brasiliensis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 8, p. 2814-2819, 2006.

MASSIS, L. M.; BRAGA, C. J.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; LAUAND, C.; NEWTON, S. M., KLEBBA, P. E.; FERREIRA, L. C. Anti-flagellin antibody responses elicited in mice orally immunized with attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium vaccine strains. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 6, p. 606-610, 2008.

MCCANCE, D. J. Human papillomaviruses and cervical cancer. **J. Med. Microbiol.,** v. 47, n. 5, p. 371-373. 1998.

MCEWEN, J.; LEVI, R.; HORWITZ, R. J.; ARNON, R. Synthetic recombinant vaccine expressing influenza haemagglutinin epitope in Salmonella flagellin leads to partial protection in mice. **Vaccine**, v. 10, n. 6, p. 405-411, 1992.

MCMICHAEL, A. J. HIV vaccines. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 24, p. 227-2255, 2006.

MCMURRAY, H. R.; NGUYEN, D., WESTBROOK, T. F., MCANCE, D. J. Biology of human papillomaviruses. **Int. J. Exp. Pathol.,** v. 82, n. 1, p. 15-33, 2001.

MCSORLEY, S. J.; COOKSON, B. T., JENKINS, M. K. Characterization of CD4+ T cell responses during natural infection with Salmonella typhimurium. **J. Immunol.**, v. 164, n. 2, p. 986-993, 2000.

MCSORLEY, S. J.; EHST, B. D.; YU, Y.; GEWIRTZ, A. T. Bacterial flagellin is an effective adjuvant for CD4+ T cells in vivo. **J. Immunol.**, v. 169, n. 7, p. 3914-3919, 2002.

MCSORLEY, S. J.; JENKINS, M. K. Antibody is required for protection against virulent but not attenuated Salmonella enterica serovar typhimurium. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 6, p. 3344-3348, 2000.

MENDES-GIANNINI, M. J.; MONTEIRO, S. J. L.; DE FATIMA, S. J.; DONOFRIO, F. C.; MIRANDA, E. T.; ANDREOTTI, P. F.; SOARES, C. P. Interactions of Paracoccidioides brasiliensis with host cells: recent advances. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 237-248, 2008.

MIAO, E. A.; ANDERSEN-NISSEN, E.; WARREN, S. E.; ADEREM, A. TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. **Semin. Immunopathol.**, v. 29, n. 3, p. 275-288, 2007.

MIYAHIRA, Y.; MURATA, K.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J. R.; ESTEBAN, M.; RODRIGUES, M. M.; ZAVALA, F. Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. **J. Immunol. Methods.**, v. 181, n. 1, p. 45-54, 1995.

MIYAJI, E. N.; CARVALHO, E.; OLIVEIRA, M. L.; RAW, I.; HO, P. L. Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 44, n. 6, p. 500-513, 2011.

MIZEL, S. B.; GRAFF, A. H.; SRIRANGANATHAN, N.; ERVIN, S., LEES, C. J.; LIVELY, M. O.; HANTGAN, R. R.; THOMAS, M. J.; WOOD, J.; BELL, B. Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 16, n. 1, p. 21-28, 2009.

MIZEL, S. B.; HONKO, A. N.; MOORS, M. A.; SMITH, P. S.; WEST, A. P. Induction of macrophage nitric oxide production by Gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric Toll-like receptor 5/Toll-like receptor 4 complexes. **J. Immunol.**, v. 170, n. 12, p. 6217-6223, 2003.

MUNOZ, N.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSE, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUE, X.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J.; MEIJER, C. J. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, n. 6, p. 518-527, 2003.

MURTHY, K. G.; DEB, A.; GOONESEKERA, S.; SZABO, C.; SALZMAN, A. L. Identification of conserved domains in Salmonella muenchen flagellin that are essential for its ability to activate TLR5 and to induce an inflammatory response in vitro. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 7, p. 5667-5675, 2004.

NEAD, M. A.; BAGLIA, L. A.; ANTINORE, M. J.; LUDLOW, J. W.; MCCANCE, D. J. Rb binds c-Jun and activates transcription. **EMBO J.**, v. 17, n. 8, p. 2342-2352, 1998.

NEWTON, S. M.; JACOB, C. O.; STOCKER, B. A. Immune response to cholera toxin epitope inserted in Salmonella flagellin. **Science**, v. 244, n. 4900, p. 70-72, 1989.

NEWTON, S. M.; KOTB, M.; POIRIER, T. P.; STOCKER, B. A.; BEACHEY, E. H. Expression and immunogenicity of a streptococcal M protein epitope inserted in Salmonella flagellin. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 6, p. 2158-2165, 1991a.

NEWTON[b], S. M.; WASLEY, R. D.; WILSON, A.; ROSENBERG, L. T.; MILLER, J. F.; STOCKER, B. A. Segment IV of a Salmonella flagellin gene specifies flagellar antigen epitopes. **Mol. Microbiol.**, v. 5, n. 2. p. 419-425, 1991.

NEWTON, S. M.; C. Joys, T.M.; ANDERSON, S. A.; KENNEDY, R. C.; HOVI, M. E.; STOCKER, B. D. A. Expression and immunogenicity of an 18-residue epitope of HIV1 gp41 inserted in the flagellar protein of Salmonella live vaccine. **Res. Microbiol.**, v. 146, p. 203-216, 1995.

NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R. S. Development of a sporozoite malaria vaccine. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 35, n. 4, p. 678-688, 1986.

_____. Rationale for the development of an engineered sporozoite malaria vaccine. **Adv. Immunol.**, v. 45, p. 283-334, 1989.

O'HAGAN, D. T.; RAPPUOLI, R. The safety of vaccines**. Drug Discov. Today**, v. 9, n. 19, p. 846-854, 2004.

O'HAGAN, D. T.; VALIANTE, N. M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, n. 9, p. 727-735, 2003.

OGG, G. S.; JIN, X.; BONHOEFFER, S.; DUNBAR, P. R.; NOWAK, M. A.; MONARD, S.; SEGAL, J. P.; CAO, Y.; ROWLAND-JONES, S. L.; CERUNDOLO, V.; HURLEY, A.; MARKOWITZ, M.; HO, D. D.; NIXON, D. F.; MCMICHAEL, A. J. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. **Science**, v. 279, n. 5359, p. 2103-2106, 1998.

OKADA, E.; SASAKI, S.; ISHII, N.; AOKI, I.; YASUDA, T.; NISHIOKA, K.; FUKUSHIMA, J.; MIYAZAKI, J.; WAHREN, B.; OKUDA, K. Intranasal immunization of a DNA vaccine with IL-12- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-expressing plasmids in liposomes induces strong mucosal and cell-mediated immune responses against HIV-1 antigens**. J. Immunol.**, v. 159, n. 7, p.3638-3547, 1997.

PAAVONEN, J. Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer and related genital neoplasias. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 11, p. 3-9, 2007, Suppl 2.

PASHINE, A.; VALIANTE, N. M.; ULMER, J. B. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants**. Nat. Med.**, v. 11, n. 4, p. 63-68, 2005.

PENG, G.; GUO, Z.; KINIWA, Y., VOO, K. S.; PENG, W.; FU, T.; WANG, D. Y.; LI, Y.; WANG, H. Y.; WANG, R. F. Toll-like receptor 8-mediated reversal of $CD4^+$ regulatory T cell function. **Science**, v. 309, n. 5739, p.1380-1384, 2005.

PINO, O.; MARTIN, M.; MICHALEK, S. M. Cellular mechanisms of the adjuvant activity of the flagellin component FljB of Salmonella enterica Serovar Typhimurium to potentiate mucosal and systemic responses. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 10, p. 6763-6770, 2005.

RAMOS, H. C.; RUMBO, M.; SIRARD, J. C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. **Trends Microbiol.**, v. 12, n. 11, p. 509-517, 2004.

RAVINDRAN, R.; MCSORLEY, S. J. Tracking the dynamics of T-cell activation in response to Salmonella infection. **Immunology,** v. 114, n. 4, p. 450-458, 2005.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTANEDA, E. The habitat of Paracoccidioides brasiliensis: how far from solving the riddle? **Med. Mycol.**, v. 39, n. 3, p. 233-241, 2001.

RHEE, S. H.; IM, E.; POTHOULAKIS, C. Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer. **Gastroenterology**, v. 135, n. 2, p. 518-528, 2008.

RODRIGUES, M. M.; CORDEY, A. S.; ARREAZA, G.; CORRADIN, G.; ROMERO, P.; MARYANSKI, J. L.; NUSSENZWEIG, R. S.; ZAVALA, F. CD8+ cytolytic T cell clones derived against the Plasmodium yoelii circumsporozoite protein protect against malaria. **Int. Immunol.**, v. 3, n. 6, p. 579-585, 1991.

ROMAN, M.; MARTIN-OROZCO, E.; GOODMAN, J. S.; NGUYEN, M. D.; SATO, Y.; RONAGHY, A.; KORNBLUTH, R. S.; RICHMAN, D. D.; CARSON, D. A.; RAZ, E. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. **Nat. Med.**, v. 3, n. 8, p. 849-854, 1997.

ROMERO, P.; MARYANSKI, J. L.; CORRADIN, G.; NUSSENZWEIG, R. S.; NUSSENZWEIG, V.; ZAVALA, F. Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. **Nature**, v. 341, n. 6240, p. 323-326. 1989.

ROSENBERG, E. S.; BILLINGSLEY, J. M.; CALIENDO, A. M.; BOSWELL, S. L.; SAX, P. E.; KALAMS, S. A.; WALKER, B. D. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. **Science**, v. 278, n. 5342, p. 1447-1450, 1997.

RYDBERG, C.; MANSSON, A.; UDDMAN, R.; RIESBECK, K.; CARDELL, L. O. Toll-like receptor agonists induce inflammation and cell death in a model of head and neck squamous cell carcinomas. **Immunology**, v. 128, n. 1, p. 600-611, 2009.

SALAUN, B.; COSTE, I.; RISSOAN, M. C.; LEBECQUE, S. J.; RENNO, T. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. **J. Immunol.**, v. 176, n. 8, p. 4894-4901, 2006.

SALMAN, H. H.; IRACHE, J. M.; GAMAZO, C. Immunoadjuvant capacity of flagellin and mannosamine-coated poly(anhydride) nanoparticles in oral vaccination. **Vaccine**, v. 27, n. 35, p. 4784-4790, 2009.

SAN-BLAS, G.; NINO-VEJA, G.; ITURRIAGA, T. Paracoccidioides brasiliensis and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol.**, v. 40, n. 3, p. 225-242, 2002.

SASSER, A. K.; SULLIVAN, N. J.; STUDEBAKER, A. W.; HENDEY, L. F.; AXEL, A. E.; HALL, B. M. Interleukin-6 is a potent growth factor for ER-alpha-positive human breast cancer. **FASEB J.**, v. 21, n. 13, p. 3763-3770, 2007.

SCHWARTZ, S. A.; HERNANDEZ, A.; MARK E. B. The role of NF-kappaB/IkappaB proteins in cancer: implications for novel treatment strategies. **Surg. Oncol.,** v. 8, n. 3, p. 143-153, 1999.

SCHWARZ, K.; STORNI, T.; MANOLOVA, V.; DIDIERLAURENT, A.; SIRARD, J. C.; ROTHLISBERGER, P.; BACHMANN, M. F. Role of Toll-like receptors in costimulating cytotoxic T cell responses. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, n. 6, p. 1465-1470, 2003.

SEDEGAH, M.; JONES, T. R.; KAUR, M.; HEDSTROM, R.; HOBART, P.; TINE, J. A.; HOFFMAN, S. L. Boosting with recombinant vaccinia increases immunogenicity and protective efficacy of malaria DNA vaccine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 13, p. 7648-7653, 1998.

SEDEGAH, M.; WEISS, W.; SACCI JR., J. B.; CHAROENVIT, Y. ; HEDSTROM, R.; GOWDA, K.; MAJAM, V. F.; TINE, J.; KUMAR, S.; HOBART, P.; HOFFMAN, S. L. Improving protective immunity induced by DNA-based immunization: priming with antigen and GM-CSF-encoding plasmid DNA and boosting with antigen-expressing recombinant poxvirus. **J. Immunol.,** v. 164, n. 11, p. 5905-5912, 2000.

SFONDRINI, L.; ROSSINI, A.; BESUSSO, D.; MERLO, A.; TAGLIABUE, E.; MENARD, S.; BALSARI, A. Antitumor activity of the TLR-5 ligand flagellin in mouse models of cancer. **J. Immunol**., v. 176, n. 11, p. 6624-6630, 2006.

SHEN, W. H.; ZHOU, J. H.; BROUSSARD, S. R.; FREUND, G. G.; DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Proinflammatory cytokines block growth of breast cancer cells by impairing signals from a growth factor receptor. **Cancer Res.**, v. 62, n. 16, p. 4746-4756, 2002.

SHIROTA, H.; KLINMAN, D. M. CpG-conjugated apoptotic tumor cells elicit potent tumor-specific immunity. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 60, n. 5, p. 659-669, 2011.

SKOUNTZOU, I.; MARTIN MDEL, P.; WANG, B.; YE, L.; KOUTSONANOS, D.; WELDON, W.; JACOB, J.; COMPANS, R. W. Salmonella flagellins are potent adjuvants for intranasally administered whole inactivated influenza vaccine. **Vaccine**, v. 28, n. 24, p. 4103-4112, 2009.

SLEASMAN, J. W.; GOODENOW, M. M. 13 HIV-1 infection. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111, p. 582-592, 2003. Suppl. 2.

SOARES, I. S. e M. M. RODRIGUES. Malaria vaccine: roadblocks and possible solutions. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, n. 3, p. 317-332, 1998.

SONG, L.; ZHANG, Y.; YUN, N. E.; POUSSARD, A. L.; SMITH, J. N.; SMITH, J. K.; BORISEVICH, V.; LINDE, J. J.; ZACKS, M. A.; LI, H.; KAVITA, U.; REISEROVA, L.; LIU, X.; DUMUREN, K.; BALASUBRAMANIAN, B.; WEAVER, B.; PARENT, J.; UMLAUF, S.; LIU, G.; HULEATT, J.; TUSSEY, L.; PAESSLER, S. Superior efficacy of a recombinant flagellin:H5N1 HA globular head vaccine is determined by the

placement of the globular head within flagellin. **Vaccine**, v. 27, n. 42, p. 5875-5884, 2009.

SPEISER, D. E.; LIENARD, D.; RUFER, N.; RUBIO-GODOY, V.; RIMOLDI, D.; LEJEUNE, F.; KRIEG, A. M.; CEROTTINI, J. C.; ROMERO, P. Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 3, p. 739-746. 2005.

STEINMAN, R. M.; POPE, M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. **J. Clin. Invest.,** v. 109, n. 12, p. 1519-1526, 2002.

STOCKFLETH, E.; TREFZER, U.; GARCIA-BARTELS, C.; WEGNER, T.; SCHMOOK, T.; STERRY, W. The use of Toll-like receptor-7 agonist in the treatment of basal cell carcinoma: an overview. **Br. J. Dermatol.**, v. 149, p. 53-56, 2003. Suppl 66.

SUN, Y. H.; ROLAN, H. G.; TSOLIS, R. M. Injection of flagellin into the host cell cytosol by Salmonella enterica serotype Typhimurium. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 47, p. 33897-33901, 2007.

SUTMULLER, R. P.; DEN BROK, M. H.; KRAMER, M.; BENNINK, E. J.; TOONEN, L. W.; KULLBERG, B. J.; JOOSTEN, L. A.; AKIRA, S.; NETEA, M. G.; ADEMA, G. J. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. **J. Clin. Invest.**, v. 116, n. 2, p. 485-494, 2006.

TABIASCO, J.; DEVEVRE, E.; RUFER, N.; SALAUN, B.; CEROTTINI, J. C.; SPEISER, D.; ROMERO, P. Human effector CD8+ T lymphocytes express TLR3 as a functional coreceptor. **J. Immunol.**, v. 177, n. 12, p. 8708-8713, 2006.

TABORDA, C. P.; JULIANO, M. A.; PUCCIA, R.; FRANCO, M.; TRAVASSOS, L. R. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of Paracoccidioides brasiliensis which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 2, p. 786-793, 1998.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 335-376, 2003.

TAYLOR, D. N.; TREANOR, J. J.; STROUT, C.; JOHNSON, C.; FITZGERALD, T.; KAVITA, U.; OZER, K.; TUSSEY, L.; SHAW, A. Induction of a potent immune response in the elderly using the TLR-5 agonist, flagellin, with a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine (VAX125, STF2.HA1 SI). **Vaccine,** v. 29, n. 31, p. 4897-4902, 2011.

TREANOR, J. J.; TAYLOR, D. N.; TUSSEY, L.; HAY, C.; NOLAN, C.; FITZGERALD, T.; LIU, G.; KAVITA, U.; SONG, L.; DARK, I.; SHAW, A.. Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine (VAX125) in healthy young adults. **Vaccine**, v. 28, n. 52, p. 8268-8274. 2010

TSUJI, M.; ZAVALA, F. T cells as mediators of protective immunity against liver stages of Plasmodium. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 2, p. 88-93, 2003.

TURLEY, C. B.; RUPP, R. E.; JOHNSON, C.; TAYLOR, D. N.; WOLFSON, J.; TUSSEY, L.; KAVITA, U.; STANBERRY, L.; SHAW, A. Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults. **Vaccine**, v. 29, n. 32, p. 5145-5152, 2011.

VERMA, N. K.; ZIEGLER, H. K.; STOCKER, B. A.; SCHOOLNIK, G. K. Induction of a cellular immune response to a defined T-cell epitope as an insert in the flagellin of a live vaccine strain of Salmonella. **Vaccine**, v. 13, n. 3, 235-244, 1995.

VON KNEBEL, D. M.; RITTMULLER, C.; AENGENEYNDT, F.; JANSEN-DURR, P.; SPITKOVSKY, D. Reversible repression of papillomavirus oncogene expression in cervical carcinoma cells: consequences for the phenotype and E6-p53 and E7-pRB interactions. **J. Virol.**, v. 68, n. 5, p. 2811-2821, 1994.

WANG, B. Z.; QUAN, F. S.; KANG, S. M.; BOZJA, J.; SKOUNTZOU, I.; COMPANS, R. W. Incorporation of membrane-anchored flagellin into influenza virus-like particles enhances the breadth of immune responses. **J. Virol.**, v. 82, n. 23, p. 11813-11823, 2008.

WATERS, A. P.; MOTA, M. M.; VAN DIJK, M. R.; JANSE, C. J. Parasitology. Malaria vaccines: back to the future? **Science**, v. 307, n. 5709, p. 528-530, 2005.

WEI, L. N.; JOYS, T. M. Covalent structure of three phase-1 flagellar filament proteins of Salmonella. **J. Mol. Biol.**, v. 186, n. 4, p. 791-803, 1985.

WEISS, W. R.; SEDEGAH, M.; BEAUDOIN, R. L.; MILLER, L. H.; GOOD, M. F. CD8+ T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 85, n. 2, p. 573-576, 1988.

WERNESS, B. A.; LEVINE, A. J.; HOWLEY, P. M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science**, v. 248, n. 4951, p. 76-79, 1990.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. The global malaria situation: current tools for prevention & control. 55th. World Health Assembly. Global Fund to Fight AIDS, Tuberculosis & Malaria, WHO document no. 55. 2002. Available from: http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA55/ea55id6.pdf. [2011 ago 14]

YONEKURA, K.; MAKI-YONEKURA. S.; NAMBA, K. Growth mechanism of the bacterial flagellar filament. **Res. Microbiol.**, v. 153, n. 4, p. 191-197, 2002.

_____. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. **Nature**, v. 424, n. 6949, p. 643-650, 2003.

YU, L.; CHEN, S. Toll-like receptors expressed in tumor cells: targets for therapy. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 57, n. 9, p. 1271-1278, 2008.

ZERFASS, K.; SCHULZE, A.; SPITKOVSKY, D.; FRIEDMAN, V.; HENGLEIN, B.; JANSEN-DURR, P. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation**.** **J. Virol.**, v. 69, n. 10, p. 6389-6399, 1995.

ZHANG, G.; GHOSH, S. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. **J. Clin. Invest.**, v. 107, n. 1, p. 13-19, 2001.