

Universidade Federal do Ceará
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS
EFEITOS IMUNOADJUVANTES E
INFLAMATÓRIOS DOS ÓLEOS DE
OLIVA, MILHO E SOJA

Ana Cláudia Marinho da Silva

N.Cham. T 574.192 S578e

Autor: Silva, Ana Cláudia

Título: Estudo comparativo entre os efei



013838803

Ac. 69925

BCT

Fortaleza — Ceará
2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS
EFEITOS IMUNOADJUVANTES E
INFLAMATÓRIOS DOS ÓLEOS DE
OLIVA, MILHO E SOJA**

Ana Cláudia Marinho da Silva

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

FORTALEZA - CEARÁ
2004

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS EFEITOS IMUNOADJUVANTES E INFLAMATÓRIOS DOS ÓLEOS DE OLIVA, MILHO E SOJA

ANA CLÁUDIA MARINHO DA SILVA

**Tese submetida à Coordenação do Curso de pós-graduação em
Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, para a obtenção do
Título de Doutor em Bioquímica, área de concentração em
Bioquímica Vegetal**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**FORTALEZA - CEARÁ
2004**

S 578e

Silva, Ana Cláudia Marinho da

Estudo comparativo entre os efeitos
imunoadjuvantes e inflamatório dos óleos de
oliva, milho e soja/ Ana Cláudia Marinho da
Silva.- Fortaleza: 2004.

98f. : il.

Orientador : Maria da Guia Silva Lima
Tese (Doutorado) em Bioquímica – Univer-
sidade Federal do Ceará.

1. Adjuvantes 2. Óleos vegetais 3. Inflamação
I. Título.

C.D.D. 574.192

C.D.U. 577:1

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS
EFEITOS IMUNOADJUVANTES E
INFLAMATÓRIOS DOS ÓLEOS DE
OLIVA, MILHO E SOJA**

ANA CLÁUDIA MARINHO DA SILVA

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria da Guia Silva Lima

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

**FORTALEZA - CEARÁ
2004**

Esta dissertação foi apresentada, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências, área de concentração em Bioquímica vegetal, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e se encontra à disposição dos interessados na Biblioteca Central da Universidade.

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

Ana Cláudia Marinho da Silva

Dissertação aprovada em :

Dr.^a Maria de Guia Silva Lima
Dept.^o de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Orientadora

Dr. Orlando Ribeiro Garcia
Dept.^o de Imunogenética
Instituto Butantan
Co-Orientador

Dr.^a Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro
Dept.^o de Veterinária
Universidade Estadual do Ceará
Conselheiro

Dr.^a Dirce Fernandes de Melo
Dept.^o de Biologia
Universidade Federal do Ceará
Conselheiro

Dra. Maria Teresa Salles Trevisan
Dept.^o de Química Orgânica
Universidade Federal do Ceará
Conselheiro

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

“ Deus está em toda parte ao mesmo tempo, em redor de você! dentro de você! Jamais estamos desamparados. Nunca estamos sós. Não permitamos que a mágoa nos pertube: procuremos nos manter calmos, para ouvir a voz silenciosa de Deus dentro de nós. É assim que superemos todas as dificuldades que aparecem em nossos caminhos e havemos de descobrir todas as verdades que aparecem em nossos caminhos e havemos de descobrir todas as verdades que existem em todas as coisas e pessoas.”(C. Torres Pastorino).

Ana Caroline há quem diga que eu perdi o brilho no olhar, foi nesse momento que eu comecei a ver dentro da própria vida, o encanto de viver. Amo-te, filha.

À Dra. MARIA que é, magia, força, fé, suor, graça, cor e sonho...

Ao meu amado, Tevide, que há vinte anos atrás me ensinou a amar os livros.

Protocolo de laboratório 1 (1991) – Há homens que lutam um dia e são bons, há outros que lutam um mês e são ótimos, há outros que lutam 2 anos e são excelentes, há outros que lutam a vida inteira, esses são imprescindíveis.(Berchout)

Protocolo de laboratório 2 (1992)- No meio do caminho tinha uma pedra. Tinha uma pedra no meio do caminho. No meio do caminho tinha uma pedra. Tinha uma pedra no meio do caminho. No meio do caminho... (Carlos Drumond de Andrade)

Protocolo de laboratório 3 (1993)- Quando voarem minhas esperanças/
Como um bando de pombas fugitivas/ Só me restarem pálidas lembranças.
(Machado de Assis).

Protocolo de laboratório 4 (1994)- A maior experiência que um jovem pode ter é ter sido pobre um dia.

Protocolo de laboratório 5 (1995)- Nada do que foi será de novo do jeito que já foi um dia...

Protocolo de laboratório 6 (1996)- O homem desperta e sai, cada alvorada, para o acaso das coisas... E, a saída leva uma crença vaga, indefinida, de achar o Ideal nalguma encruzilhada. (Raul de Leoni).

Protocolo de laboratório 7 (1997)- Há cinco degraus para se alcançar a sabedoria: calar, ouvir, lembrar, estudar e sair.

Protocolo de laboratório 8a (1998a)- Quanto mais se sabe mais sofrimento se encontra. (Eclesiástico).

Protocolo de laboratório 8b (1998)- “Resistência faz parte da evolução, é preciso romper a resistência com persistência e autodecisão. Auto-iniciar, autoconhecer, auto-realizar. São os remos da evolução . (Suely Braz Costa)

Protocolo de laboratório 8c (1998)- O . que brilha com luz própria nada pode apagar. (Pablo Milanez).

Protocolo de laboratório 9a (1999)- Quando eu era criança falava como criança, pensava como criança. Depois que me tornei homem, fiz desaparecer o que era próprio da criança. (I Coríntios 13:11).

Protocolo de laboratório 9b (1999)- A imaginação é mais importante que o conhecimento. (Albert Einstein).

Protocolo de laboratório 10 (2000)- Às vezes dá vontade de agarrar a vida com uma, duas, dez mãos e levar á boca e trincar nos dentes como uma fruta no ponto.

Protocolo de laboratório 11 (2001)- “ Se não houver frutos, valeu a beleza das flores, se não houver flores, valeu a sombra das folhas, se não houver folhas, valeu a intenção da semente”. (Henfil).

Protocolo de laboratório 12a (2002)- 'Devemos amar os homens não por suas qualidades ou simpatias, mas porque Deus os ama.

Protocolo de laboratório 13b (2002)- De que adianta conhecer o futuro se não podemos modifica-lo.

Protocolo de laboratório 14 (2003)-Tantas vezes pensamos ter chegado, Tantas vezes é preciso ir além. (Fernando Pessoa).

AGRADECIMENTOS

À Dra. MARIA DA GUIA SILVA LIMA, por essa longa caminhada durante a minha formação e pela confiança em meu potencial. Agradeço de coração os momentos de desânimo e dificuldades que passou ao meu lado, me motivando a conquistar uma vida melhor.

À Dra. DIRCE FERNANDES DE MELO, que também acompanhou essa minha caminhada e pela oportunidade de participar daquele seu belo sorriso.

Ao Dr. ORLANDO RIBEIRO GARCIA, por participar da banca examinadora desta tese, valorizando assim meu trabalho. Agradeço também pela co-orientação, amizade, dedicação e ensinamentos científicos.

Ao poeta e cientista Dr. OSVALDO AUGUSTO SANT'ANNA, pela oportunidade de viver a ciência através da poesia.

À Dra. DIANA CÉLIA, pelas sugestões nos experimentos de Imunologia, amizade e disponibilidade durante esta caminhada. Agradeço de coração a minha aceitação.

À Dr. MARIA TEREZA SALLES TREVISAN, que contribuiu com a caracterização Bioquímica dos óleos vegetais, que com certeza, foi muito importante para vencer esta etapa.

À Dra. OLGA e à Dra. NANCY, pela oportunidade de tê-las conhecido, pela amizade e agradável convivência.

Ao casal DANIEL e VIVIANE, pela análise estatística e apoio psicológico nos momentos difíceis desta caminhada.

À Dra. DENISE LESSA NOGUEIRA, pelo incentivo, amizade, e companheirismo durante o período que eu ficava trabalhando a noite.

À Dra. VÂNIA MELO e ISABELA MONTNEGRO, pela realização do teste microbiológico e o teste de rancidez oxidativa.

À minha amiga Érica, pela valiosa companhia nas viagens que realizamos juntas e por estar sempre ao meu lado, contribuindo e participando dessa longa e difícil etapa.

À minha eterna gratidão a amiga de todas as horas, Profa. Rosa Helena Veras Mourão que me ensinou os primeiros passos da ciência.

Às amigas Desirée, Lourdinha, Erivalda, Márcia Rocha, Rosa Isabela, Alana, Helio, Adriana, Verônica e Isabel pelos gestos de carinho e pela amizade demonstrada em cada momento do nosso convívio.

A todos do Laboratório 2062, em especial as bolsistas Gabriela e Leliane, que me acompanharam em diferentes fases desse trabalho.

Aos meus pais José (In Memoriam) e Francina, que me ensinaram a viver o sentimento mais belo da vida; o amor.

Às minhas irmãs Meire e Lúcia, pelo carinho, união e convicção de um amanhã melhor.

À Domileide e Marizor pela dedicação, amor e paciência com a Ana Caroline.

À Ana Caroline que tanto chorou encostada na porta do quarto a procura de um carinho.

Ao amigo de todas as estações do ano, Tevide, que com muita dedicação, amor e carinho participou em todas as etapas dessa longa caminhada. A ele, não existem palavras que possam definir minha gratidão.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que fazem o Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, que me acolheram com muito carinho e pelo ambiente agradável de trabalho.

Aos meus belos e queridos sobrinhos Dayse, Daniele, Darwin, Everton e Helton que foram sempre motivo de alegrias e descontração.

Agradecimento especial a todos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e aos animais que tanto contribuíram para a realização desse trabalho.

À Deus, por estar presente em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Universidade Federal do Ceará (UFC), através do Laboratório de Oxidações Biológicas. Pela oportunidade de realização do Curso.

À Coordenação de Nível Superior (CAPES), por intermédio do programa institucional de capacitação de docentes e técnicos (PICDT), pela concessão de bolsas de estudos.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

SUMÁRIO

Conteúdo	Página
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xxii
ABREVIATURAS.....	xxiii
RESUMO.....	xxiv
ABSTRACT.....	xxvi
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Adjuvantes.....	1
1.1.1- Histórico.....	1
1.1.2- Classificação dos adjuvantes.....	2
1.1.3- Mecanismo de Ação.....	7
1.1.4- Emulsões.....	11
1.2- Caracterização físico-química dos óleos de soja, milho e oliva.....	14
1.3- Imunidade inata e Imunidade adquirida.....	15
1.4- Reação inflamatória.....	19
2- OBJETIVOS.....	27
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1- MATERIAS.....	28
3.1.1- Animais.....	28

3.1.2- Óleos.....	28
3.2- MÉTODOS.....	28
3.2.1- Estudo da atividade antioxidante dos óleos vegetais.....	28
3.2.2- Análise microbiológica e teste de rancidez oxidativa dos óleos vegetais comestíveis	31
3.2.3- Preparação das Emulsões.....	31
3.2.4- “Droplet test”.....	31
3.2.5- Imunização por Via Subcutânea.....	31
3.2.6- Esquema de Imunização	32
3.2.7- Grupos Experimentais.....	32
3.2.8- Obtenção de soros.....	33
3.2.9- Teste de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay.....	33
3.2.10- Anafilaxia Cutânea Passiva(PCA).....	34
3.2.11- Modelo da Bolsa de Ar Subcutânea (BAS).....	35
3.2.12- Efeito dos óleos vegetais sobre a produção de nitrito in vivo no modelos de bolsa de ar subcutânea.....	35
3.2.13- Método Estatístico.....	36
4- RESULTADOS.....	37
4.1- Caracterização bioquímica e microbiológica dos óleos de oliva, milho e soja.....	37
4.2- Efeito imunoadjuvante dos óleos de soja, milho e oliva sobre a síntese de Igs específicas (G, A e M).....	44
4.2.1- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de oliva (OOC e OOS) em relação à imunização com ovalbumina pura.....	44

4.2.2- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de oliva (OOC e OOS) em relação aos efeitos do $Al(OH)_3$ e do marcol.....	44
4.2.3- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de oliva (OOC e OOS) em relação ao efeito do adjuvante de Freund.....	46
4.2.4- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de soja (OSC e OSS) em relação à imunização com ovalbumina pura.....	46
4.2.5- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de soja (OSC e OSS) em relação aos efeitos do $Al(OH)_3$ e do marcol.....	46
4.2.6- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de soja (OSC e OSS) em relação ao efeito do adjuvante de Freund.....	49
4.2.7- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de milho (OMC e OMS) em relação à imunização com ovalbumina pura.....	49
4.2.8- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de milho (OMC e OMS) em relação aos efeitos do $Al(OH)_3$ e do marcol.....	49
4.2.9- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de milho (OMC e OMS) em relação ao efeito do adjuvante de Freund.....	52
4.2.10- Efeito imunoadjuvante comparativo entre os óleos comestíveis (oliva, milho e soja).....	52
4.2.11- Efeito imunoadjuvante comparativo entre os óleos de oliva, soja e milho com procedência controlada (Sigma).....	52
4.3- Efeito imunoadjuvante dos óleos de soja, milho e oliva sobre a síntese de IgE específica.....	54
4.3.1- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de oliva (OOC e OOS) em relação à imunização com ovalbumina pura.....	54

4.3.2- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de oliva (OOC e OOS) em relação os efeitos do Al(OH) ₃ e do marcol.	54
4.3.3- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de oliva (OOC e OOS) em relação ao efeito do adjuvante de Freund.....	57
4.3.4- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de soja (OSC e OSS) em relação à imunização com ovalbumina pura.....	57
4.3.5- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de soja (OSC e OSS) em relação aos efeitos do Al(OH) ₃ e do marcol.	60
4.3.6- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de soja (OSC e OSS) em relação ao efeito do adjuvante de Freund.....	60
4.3.7- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de milho (OMC e OMS) em relação à imunização com ovalbumina pura.....	62
4.3.8- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de milho (OMC e OMS) em relação aos efeitos do Al(OH) ₃ e do marcol.....	62
4.3.9- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de soja (OMC e OMS) em relação ao efeito do adjuvante de Freund.....	62
4.3.10- Efeito imunoadjuvante comparativo entre os óleos comestíveis (oliva, soja e milho).....	65
4.3.11- Efeito imunoadjuvante comparativo entre os óleos de oliva, soja e milho de procedência controlada (PA/Sigma).....	65
4.4- Resposta Inflamatória induzida pelos óleos de oliva, milho e soja avaliada por migração celular.....	67
4.4.1- Avaliação da migração de neutrófilos induzida pelos óleos de oliva (OOS e	

OOO), soja (OSS e OSC) e milho (OMS e OMC) em comparação ao adjuvante de Freund, Al(OH) ₃ e Marcol após 6 e 24 horas de Reação inflamatória.....	67
4.4.2- Avaliação da migração de macrófagos induzida pelos óleos de oliva (OOS e OOC), soja (OSS e OSC) e milho (OMS e OMC) em comparação aoadjuvante de Freund, Al(OH) ₃ e Marcol após 6 e 24 horas de Reação inflamatória.....	67
4.4.3- Avaliação da migração de eosinófilos induzida pelos óleos de oliva (OOS e OOC), soja (OSS e OSC) e milho (OMS e OMC) em comparação ao adjuvante de Freund, Al(OH) ₃ e Marcol após 6 e 24 horas de Reação Inflamatória.....	69
4.4.4- Avaliação da migração de leucócitos totais induzida pelos óleos de oliva (OOS eOOO), soja (OSS e OSC) e milho (OMS e OMC) em comparação ao adjuvante de Freund, ao Al(OH) ₃ e ao Marcol após 6 e 24 horas de Reação Inflamatória.....	69
4.4.5- Avaliação dos efeitos dos óleos de soja, milho e oliva sobre a produção de nitrito (NO ⁻²) in vivo na BAS (Bolsa de Ar subcutânea) vegetais e adjuvantes clássicos.....	71
4.4.6- Correlação entre os efeitos imunológicos e inflamatório dos óleos vegetais e adjuvantes clássicos.....	71
5- DISCUSSÃO.....	76
6- CONCLUSÃO.....	84
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1 - Visualização de diferentes conceitos de adjuvanticidade.....	4
Figura 2 - Adjuvantes da Imunidade Inata e Adquirida.....	5
Figura 3 - Requisitos Apropriados a um Adjuvante.....	6
Figura 4 - Regulação da célula T por TLRs em APCs.....	17
Figura 5 - Representação das etapas da migração celular. Fonte: SALVEMINI <i>et al.</i> , (2002).....	22
Figura 6 - Protocolo de extração dos compostos fenólicos dos óleos vegetais.....	29
Figura 7 – Esquema da geração de espécie reativa de oxigênio no sistema de Hipoxantina/Xantina Oxidase.....	30
Figura 8 – Cromatogramas do Óleo de Oliva comestível (A) Compostos não Fenólicos (278nm) e (B) Fenólicos(325nm).....	39
Figura 9 – Cromatogramas do Óleo de Soja de Procedência Sigma (A) Compostos não Fenólicos (270nm) e (B) Fenólicos (325nm).....	40
Figura 10 – Cromatogramas do Óleo de Soja Comestível (A) Compostos não Fenólicos (278nm) e (B) Fenólicos (325nm).....	41
Figura 11 – Cromatogramas do Óleo de Milho de Procedência Sigma (A) Compostos não Fenólicos (278nm) e (B) Fenólicos (325nm).....	42

Figura 12 – Cromatogramas do Óleo de Milho Comestível (A) Compostos não Fenólicos (278nm) e (B) Fenólicos (325nm)..... 43

Figura 13 – Cinética das Sínteses das imunoglobulinas (G, A e M), determinadas por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada ao óleo de oliva de procedência Sigma (OOS), e ao óleo de oliva Comercial (OOC). ^{a, b} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey..... 45

Figura 14 – Cinética das Sínteses das imunoglobulinas (G, A e M), determinadas por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada ao $Al(OH)_3$, Marcol e ao óleo de oliva (OOS e OOC) ^{a, b, c, d} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey..... 45

Figura 15 – Cinética das sínteses das imunoglobulinas (G, A e M), determinadas por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada CFA1, CFA2, OOS e OOC. ^{a, b} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey..... 47

Figura 16 – Cinética das sínteses das imunoglobulinas (G, A e M), determinadas por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada ao óleo de soja de procedência Sigma (OOS) e ao óleo de soja comercial (OOC). ^{a, b, c} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey..... 47

Figura 17 – Cinética das sínteses das imunoglobulinas (G, A e M),

determinadas por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada Al(OH)₃, Marcol, OSS e OSC. ^{a, b, c} indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05) determinados pelo teste de Tukey..... 48

Figura 18 – Cinética das sínteses das imunoglobulinas (G, A e M), determinadas por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada a CFA1, CFA2, OSS e OSC. ^{a, b, c} indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05) determinados pelo teste de Tukey..... 50

Figura 19 – Cinética das sínteses das imunoglobulinas (G, A e M), determinadas por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada ao óleo de milho de procedência Sigma (OMS) e ao óleo de milho comercial. ^{a, b} indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05) determinados pelo teste de Tukey..... 51

Figura 20 – Cinética das sínteses das imunoglobulinas (G, A e M), determinadas por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada ao Al(OH)₃, Marcol, OMS e OMC. ^{a, b, c} indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05) determinados pelo teste de Tukey..... 51

Figura 21 – Cinética das sínteses das imunoglobulinas (G, A e M), determinadas por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada a CFA1, CFA2, OMS e OMC ^{a, b} indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05) determinados pelo teste de Tukey..... 53

Figura 22 – Cinética das sínteses das imunoglobulinas (G, A e M),

determinadas por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada aos óleos comestíveis de oliva, soja e milho. ^{a, b, c} indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05) determinados pelo teste de Tukey..... 53

Figura 23 – Cinética das sínteses das imunoglobulinas (G, A e M), determinadas por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada aos óleos procedência Sigma oliva, soja e milho. ^{a, b, c} indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05) determinados pelo teste de Tukey..... 55

Figura 24 – Cinética das sínteses de IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada ao óleo de oliva de procedência Sigma (OOS) e ao óleo de oliva comercial (OOC). ^{a, b, c, d} indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05) determinados pelo teste de Tukey..... 56

Figura 25 – Cinética das sínteses de IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada ao Al(OH)₃, Marcol, OOS e OOC ^{a, b, c} indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05) determinados pelo teste de Tukey..... 56

Figura 26 – Cinética das sínteses de IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada ao CFA1, CFA2, OOS e OOC. ^{a, b, c, d} indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05) determinados pelo teste de Tukey..... 58

Figura 27 – Cinética das sínteses de IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada ao óleo de soja de procedência Sigma (OSS) e ao óleo de soja de procedência Comercial (OSC). ^{a, b} indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05)

determinados pelo teste de Tukey..... 59

Figura 28 – Cinética das sínteses de IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada ao Al(OH)₃, Marcol, OSS e OSC. ^{a, b, c} indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05) determinados pelo teste de Tukey..... 61

Figura 29 – Cinética das sínteses de IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada a CFA1, CFA2, OSS e OSC. ^{a, b, c} indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05) determinados pelo teste de Tukey..... 61

Figura 30 – Cinética das sínteses de IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada ao óleo de milho de procedência Sigma (OMS) e ao óleo de milho Comercial (OMC). ^{a, b} indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05) determinados pelo teste de Tukey..... 63

Figura 31 – Cinética das sínteses de IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada ao Al(OH)₃, Marcol, OMS e OMC. ^{a, b, c} indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05) determinados pelo teste de Tukey..... 64

Figura 32 – Cinética das sínteses de IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada ao CFA1, CFA2, OMS e OMC. ^{a, b, c, d} indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05) determinados pelo teste de Tukey..... 64

Figura 33 – Cinética das sínteses de IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada aos óleos comestíveis de oliva, milho e soja. ^{a, b} indicam diferenças significativas entre

os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey..... 66

Figura 34 – Cinética das sínteses de IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com $10\mu\text{g}$ de ovalbumina pura e associada aos óleos de procedência Sigma de oliva, milho e soja. ^{a, b} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey..... 66

.....
Figura 35 – Efeito dos óleos vegetais sobre a migração de neutrófilos em bolsa de ar subcutânea após 6 e 24 horas de reação inflamatória em camundongos Swiss. ^{a,b,c} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey..... 68

Figura 36 – Efeito dos óleos vegetais sobre a migração de macrófagos em bolsa de ar subcutânea após 6 e 24 horas de reação inflamatória em camundongos Swiss. ^{a,b,c,d,e} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey..... 68

Figura 37 – Efeito dos óleos vegetais sobre a migração de eosinófilos em bolsa de ar subcutânea após 6 e 24 horas de reação inflamatória em camundongos Swiss. ^{b,c,d} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey..... 70

Figura 38 – Efeito dos óleos vegetais sobre a migração de leucócitos em bolsa de ar subcutânea após 6 e 24 horas de reação inflamatória em camundongos Swiss. ^{a,b,c} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey..... 70

Figura 39 – Produção de NO em bolsa de ar subcutânea induzida por óleos vegetais após 6 e 24 horas de reação inflamatória em camundongos Swiss. ^{a,b,c,d,e} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$)

determinados pelo teste de Tukey..... 73

Figura 40 – Efeito do Alume e CFA sobre a resposta imune secundária (RS) e terciária (RT) em camundongos imunizados com 10µg de ovalbumina e sobre a resposta inflamatória: MAC (6 h): migração de macrófagos após 6 h; MAC (24h) migração de macrófagos após 24 h; NEU 6 h: migração de neutrófilos após 6 h; NEU 24 h migração de neutrófilos após 24 h e NO 6 h: produção de óxido nítrico após 6 h NO 24 h: produção de óxido nítrico após 24 h e atividade antioxidante (AOX). (a) Alume - hidróxido de alumínio e (b) CFA - adjuvante completo de Freund)..... 74

Figura 41 – Efeito dos óleos vegetais de procedência Sigma sobre a resposta imune secundária (RS) e terciária (RT) em camundongos imunizados com 10µg de ovalbumina e sobre a resposta inflamatória: (MAC (6 h): migração de macrófagos após 6 h; MAC (24h) migração de macrófagos após 24 h; NEU 6 h: migração de neutrófilos após 6 h; NEU 24 h migração de neutrófilos após 24 h e NO 6 h: produção de óxido nítrico após 6 h NO 24 h: produção de óxido nítrico após 24 h e atividade antioxidante (AOX). (a) OOS- óleo de oliva Sigma, (b) OMS- óleo de milho Sigma e (c) OSS- óleo de soja Sigma)..... 75

Figura 42 – Efeito dos óleos vegetais comestíveis sobre a resposta imune secundária (RS) e terciária (RT) em camundongos imunizados com 10µg de ovalbumina e sobre a resposta inflamatória: (MAC (6h): migração de macrófagos após 6 h; MAC (24h) migração de macrófagos após 24 h; NEU 6 h: migração de neutrófilos após 6 h; NEU 24 h migração de neutrófilos após 24 h e NO 6 h: produção de óxido nítrico após 6 h NO 24 h: produção de óxido nítrico após 24 h e atividade antioxidante (AOX). (a) OOC- óleo de oliva comestível, (b) OMC- óleo de milho comestível e (c) OSC- óleo de soja comestível)..... 76

LIISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 1 - Classificação dos adjuvantes de acordo com os eventos imunológicos que eles induzem	04
Tabela 2 - Tempo de Permanência da Gota.....	38
Tabela 3 - Atividade Antioxidante.....	38

ABREVIATURAS

- CD** - Cluster of "differentiation", agrupamentos de determinantes antigênicos característicos de leucócitos
- CD4** - Molécula de adesão presente em células T restritas a classe II do MHC
- CD8**- Molécula de adesão presente em linfócitos restritas a classe I do MHC
- DHE**- Dehidroepiandrosterona
- FCA** - Adjuvante completo de Freund
- FIA** - Adjuvante incompleto de Freund
- ICAM-1** - CD54
- IFN** - Interferon
- IgA** - Imunoglobulina A
- IgE** - Imunoglobulina E
- IgG** - Imunoglobulina G
- IgM** - Imunoglobulina M
- IL** - Interleucina
- ISCOM**- Complexo Imunoestimulante
- LFA** - Antígenos funcionais de linfócitos
- LPS** - lipopolissacarídeo
- Mac** - CD11b/CD18
- MHC**- Complexo de histocompatibilidade
- MPL** - Monofosforil lipídio A
- NBP** - Polímeros não iônicos
- T** - linfócitos/célula – linfócitos derivados do Timo
- TNF** - Fator de necrose tumoral
- VCAM**- Moléculas de adesão da célula vascular
- VLA** - Antígeno muito tardio
- NO**- óxido nítrico
- Al(OH₃)**- Hidróxido de alumínio
- ALUME**- Hidróxido de alumínio
- CTL**- Linfócitos T citotóxico ou citolíticos
- Th**- Células auxiliares
- PAMPS**- Pátogenos associados a padrões microbianos
- PRRs**- Receptor de pátogenos
- APCs** -Células apresentadora de antígeno
- DTP**- Toxóide difetérica/*pertussis*
- CpGs**- Oligo-desoxinucleotídeo
- (OH)**- Ânion hidroxil
- (O₂)**- Anion superóxido
- OVA**- Ovalbumina

IBRTECA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

RESUMO

Há mais de um século uma grande quantidade de substâncias vêm sendo usadas como adjuvantes imunológicos para tornar os procedimentos de imunização e de vacinação mais eficientes. Apesar disso, o $\text{Al}(\text{OH})_3$ continua sendo um dos poucos adjuvantes licenciados para vacinação humana. A importância do conhecimento de novos adjuvantes e de seus mecanismos de ação fica evidenciada quando se sabe que, atualmente, a nova geração de vacinas somente dará bons resultados se ministradas com um adjuvante adequado. Conhecer o adjuvante adequado, capaz de obter um resultado confiável dos procedimentos de imunização/vacinação vem sendo um tema atraente para os que se interessam pelo tema. O uso de óleos vegetais como adjuvantes é atraente por serem biologicamente degradáveis e já com efeito comprovado, a despeito da indução de efeitos colaterais de natureza alérgica. Os óleos de oliva, soja e milho foram analisados quimica e microbiologicamente e, posteriormente, grupos de 10 camundongos swiss foram imunizados por via subcutânea com ovalbumina (OVA, 10 μg , controle) e OVA em NaCl 0,15 M emulsionada em marcol, $\text{Al}(\text{OH})_3$, Adjuvante completo de Freund (FCA) ou com os óleos de oliva, soja ou milho. Os camundongos foram sangrados pelo plexo retro-orbital nos dias 14, 21, 35, 42, 49, 56, 63, 70 e 77 depois da primeira injeção. Reforços foram dados nos dias 21 e 35. Para avaliar a capacidade imunoadjuvante, anticorpos anti-OVA (IgG, IgM e IgA) foram quantificados por ELISA e IgE por Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA) em ratos. A reação inflamatória induzida por $\text{Al}(\text{OH})_3$, CFA, marcol e pelos três óleos vegetais foi avaliada pelo modelo da Bolsa de ar subcutânea (BSA) e foram quantificadas as migrações de leucócitos totais, neutrófilos, macrófagos e eosinófilos. Foram ainda determinadas a produção de óxido nítrico (NO) e a capacidade antioxidante dos óleos. No que diz respeito ao efeito imunoadjuvante dos óleos vegetais pode ser concluído, que o óleo de oliva tem maior efeito adjuvante sobre a síntese de imunoglobulinas (G, A e M) e menor efeito sobre a síntese de IgE que os óleos de soja e milho o que faria deste óleo um adjuvante preferencial nos protocolos de imunização/vacinação. De uma maneira geral, os três óleos vegetais induziram acentuada reação inflamatória, quer com 6 h quer com 24 h, embora essa ação não tenha sido

uniforme e os óleos de procedência Sigma apresentaram uma atividade inflamatória mais precoce e mais intensa que a dos óleos comestíveis. Devido à variação encontrada nos resultados obtidos, segundo os critérios selecionados para avaliar a resposta inflamatória (migração de leucócitos totais, migração de neutrófilos, migração de macrófagos, migração de eosinófilos, produção de NO e capacidade antioxidante dos óleos), não foi ainda possível estabelecer, de modo quantitativo e preciso, a correlação entre as duas respostas imunológicas.

ABSTRACT

Since more than a century, a great amount of substances have been used as immunological adjuvants in order to improve the immunization/vaccination procedures. In spite of that, Al (OH)₃ continues being one of the few licensed adjuvants for human vaccination. The importance of the knowledge of new adjuvants and of their action mechanisms is evidenced when it is known that, nowadays, the new generation of vaccines will only give good results if supplied with an appropriate adjuvant. To find out the adequate adjuvant, capable to obtain a reliable result in the immunization/vaccination procedures is being an attractive theme for the ones interested in the subject. The use of vegetable oils as adjuvants is attractive since they are biologically degraded and such effect has already been proven, in spite of the induction of collateral effects of allergic nature. The olive soy and corn oils were analyzed chemistry and microbiologically and groups of 10 swiss mice were subcutaneously immunized with ovalbumina (OVA, 10 µg, control) and OVA in NaCl 0,15 M emulsified in marcol, Al (OH)₃, Complete Freund Adjuvante (CFA) or with olive soy or corn oils. The mice were bled through the retro-orbital plexus on days 14, 21, 35, 42, 49, 56, 63, 70 and 77 after the first injection. Booster injections were given on days 21 and 35. To evaluate the immunological adjuvant capacity, antibodies anti-OVA (IgG, IgM and IgA) were quantified through ELISA and IgE through Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA) in rats. The inflammatory reaction induced by Al (OH)₃, CFA, marcol and by the three vegetable oils was evaluated by the model of the Subcutaneous Air Pouch (SAP) and the migrations of total leucocytes, neutrophils, macrophages and eosinophils were quantified. The production of nitric oxide (NO) and the antioxidant capacity of the oils were also determined. Concerning the immunological adjuvant effect of the vegetable oils it can be concluded, that the olive oil has larger adjuvant effect on the immunoglobulins synthesis (G, A and M) and a smaller effect on the IgE synthesis than that of soy and corn oils and it could be used as a preferential adjuvant in the immunization/vaccination procedures. In a general way, the three vegetable oils induced accentuated inflammatory reaction after either 6 or 24 h, although that action has not been uniform and the oils

produced by Sigma presented an earlier and more intense inflammatory activity. Due to the variation found in the obtained results, according to the criteria selected to evaluate the inflammatory response (migration of total leucocytes, neutrophils, macrophages, eosinophils, production of NO and antioxidant capacity of the oils), it was not still possible to establish, in a quantitative and precise way, the correlation among the two immunologic responses.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Adjuvantes

1.1.1- Histórico

O papel dos imunoadjuvantes é, atualmente, aceito como o de promover a indução e ativar a resposta antígeno-específica por modulação do sistema imune (AUDIBERT, 2003). Teoricamente, cada molécula ou substância capaz de amplificar ou intensificar a cascata de eventos imunológicos que compõem a resposta imune pode ser reconhecida como adjuvante (SCHIJNS, 2003).

Os adjuvantes pertencem à história da imunologia básica e aplicada, sendo os primeiros registros datados de 1919, quando Le Moignie & Pinoy mostraram que emulsões de óleo mineral aumentavam a resposta imune contra um antígeno. Entretanto, a primeira denominação do termo adjuvante foi introduzida por RAMON (1924-1926), quando ele estudou a inflamação local causada por componentes bacterianos e correlacionou-a com o aumento do título de anticorpos. Ainda, em 1926, Glenny, mostrou que a suspensão do precipitado de alume no toxóide antidiftérico era dotado de elevada capacidade antigênica.

O alume há mais de 70 anos vem sendo utilizado como adjuvante na produção de vacinas e dois métodos têm sido tradicionalmente usados: O primeiro envolve a adição de uma solução de alume ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) ao antígeno para formar o precipitado de aluminato de proteína (antígeno) e o segundo envolve a adição de solução de antígeno para preparar hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$), fosfato de alumínio ($AlPO_4$), hidróxido de alumínio com fosfato ou óxido de alumínio- γ (CLEMENTS & GRIFFITHS, 2002).

FREUND *et al.*, (1937), estudando cobaias infectadas com *Mycobacterium tuberculosis* mostraram que eles produziam altos títulos de anticorpos e que efeitos similares poderiam ser induzidos por imunizações com outras proteínas antigênicas

associadas a *Mycobacterium tuberculosis* inativado em uma emulsão de água e parafina. Em alguns casos, foi visto que não era necessária a presença do bacilo da tuberculose. Essa foi a origem dos adjuvantes que ficaram conhecidos como Adjuvantes Incompletos de Freund (IFA) em ausência de microrganismos inativados e o Adjuvante Completo de Freund (CFA) na presença de bacilos inativados na emulsão.

Os trabalhos de JOHNSTON (1956), ELLOUZ *et al.*, (1974) mostraram a atividade adjuvante de endotoxinas de bactérias Gram negativas associadas a moléculas pequenas como MDP (muramil dipeptídeo), cujas propriedades adjuvantes foram assim reconhecidas.

1.1.2- Classificação dos adjuvantes

As primeiras tentativas para organizar os adjuvantes em categorias foram feitas para facilitar a seleção de um adjuvante. Contudo, surgiram muitas dificuldades devido à variedade dos efeitos biológicos dos adjuvantes. Das diferentes análises, os adjuvantes foram classificados de diferentes maneiras. EDELMAN & TACKETT (1990) propuseram três diferentes tipos de compostos imunoestimulantes: a) adjuvantes (sais de alumínio, saponinas, muramildipeptídeo e muramiltripeptídeo, monofosforil lipídeo A, *Bordetella pertussis*, citocinas, b) transportadores (bactéria toxoide, ácidos graxos e vetores) e c) vesículas (emulsões de óleos minerais, IFA e emulsões de óleos biodegradáveis), óleos de amendoim, esqualenos, surfactantes (blocos co-polímeros não iônicos), lipossomas e microesfera de polímeros biodegradáveis.

Em 1993, AUDIBERT & LISE identificaram quatro grupos de imunoadjuvantes: a) saponinas (de origem vegetal), b) bactérias (monofosforil lipídeo A, trealose dimicolato, toxina de cólera, lipossacarídeos e seus derivados) c) substâncias químicas ($Al(OH)_3$), surfactantes, emulsões ou micro e nanopartículas) e d) grupo de Citocinas (IFN- γ ou GM-CSF) e hormônios (DHE). Entretanto, COX & COULTER (1997), propuseram classificar os adjuvantes em apenas dois grandes grupos: a) adjuvantes particulados (sais de alumínio, emulsões, ISCOM-Complexo

imune estimulantes, lipossomas, nano e micropartículas, proteossomos e virossomos) e b) adjuvantes não particulados (saponinas, lipídio A, citocinas, polímeros de carboidratos e copolímeros em blocos não iônicos). Essa classificação estava feita de acordo com cinco modos de ação dos adjuvantes: 1. imunomodulação (modificação da rede de citocinas); 2. apresentação (manutenção da estrutura do antígeno); 3. indução de CTL (Linfócitos T citotóxicos ou citolíticos); 4. determinação do antígeno-alvo e 5. formação de depósito. Os adjuvantes que são classificados conforme a natureza química, origem ou propriedades físicas, apresentam divergências nas propriedades imunomoduladoras (MARCIANI, 2003). Por exemplo, varias saponinas diferem em sua capacidade para estimular linfócitos Th1 e Th2. Assim, seria conveniente primeiro classificar os adjuvantes de acordo com a capacidade para estimular linfócitos Th1 e Th2 (correlação com célula T e imunidade humoral) e, a seguir, fazer uma subclassificação de acordo com a estrutura química. Esse sistema ajudaria a estabelecer a relação entre estrutura e função o que permitira a identificação dos farmacofatores responsáveis pela modulação imune (PRESS, 2000).

SCHIJNS (2000), citado por AUDIBERT (2003) fez uma classificação dos adjuvantes de acordo com os eventos imunológicos que eles induzem (tabela 1) e sugeriu para os adjuvantes, cinco conceitos de acordo com a imunogenicidade: 1. Conceito Geográfico de Reatividade Imune e a Teoria da Formação de Depósito que enfatizam a importância da localização do antígeno por um período de tempo após a imunização; 2. Modelo de ação dos Adjuvantes no Sinal 0 (sinalizadores do PAMPs-patógenos associados a padrões microbianos; representam a potencialidade da sinalização de substâncias nocivas que são identificadas por receptores conhecidos como PRRs- receptor de patógenos); 3. Adjuvantes que Induzem danos moleculares (destruição do tecido e necrose, infecções, estresse celular, aumento da temperatura, hipoxia, trauma, mitocôndias e proteínas de choque, hsps e hsp96). 4. papel do Sinal 2 (expressão de moléculas coestimulatórias ou citocinas) (Fig 1).

De acordo com GALLUCCI *et al.*, (1999), os sinais que causam danos moleculares não induzem apoptose celular. Portanto, um adjuvante pode ser definido como um sinal que induz danos. Dentro desse contexto, COLACO *et al.*,

Tabela 1- Classificação dos adjuvantes de acordo com os eventos imunológicos que eles induzem

Grupo	Conceito de ação	Exemplos de adjuvantes	Eventos chaves
a	Facilitação do transporte do antígeno e apresentação por APCs	ISCOMs, Quil A, Al(OH) ₃	Localização do antígeno no linfonodo
b	Efeito depósito	Emulsões água-óleo, Al(OH) ₃ , Géis, Polímero de microesfera, Copolímeros em blocos não iônicos	Prolongamento da Apresentação do antígeno
c	Sinal 0	Complemento, CpG- motifs, LPS (monofosforil lipídio A), micobactéria (muramyl dipeptidase), extrato de levedura, Toxina da coléra, ISCOMS	Sinalização do PRRs nas células da imunidade inata
d	Sinal danoso	Emulsão água-óleo, Al(OH) ₃ , IFNs, hsps,	Destruição do tecido/estresse
e	Sinal Recombinante 2	Citocinas, Moléculas coestimulatórias	Polarização APC, ajuda de células T e B

Extraído de Schijns (2000)

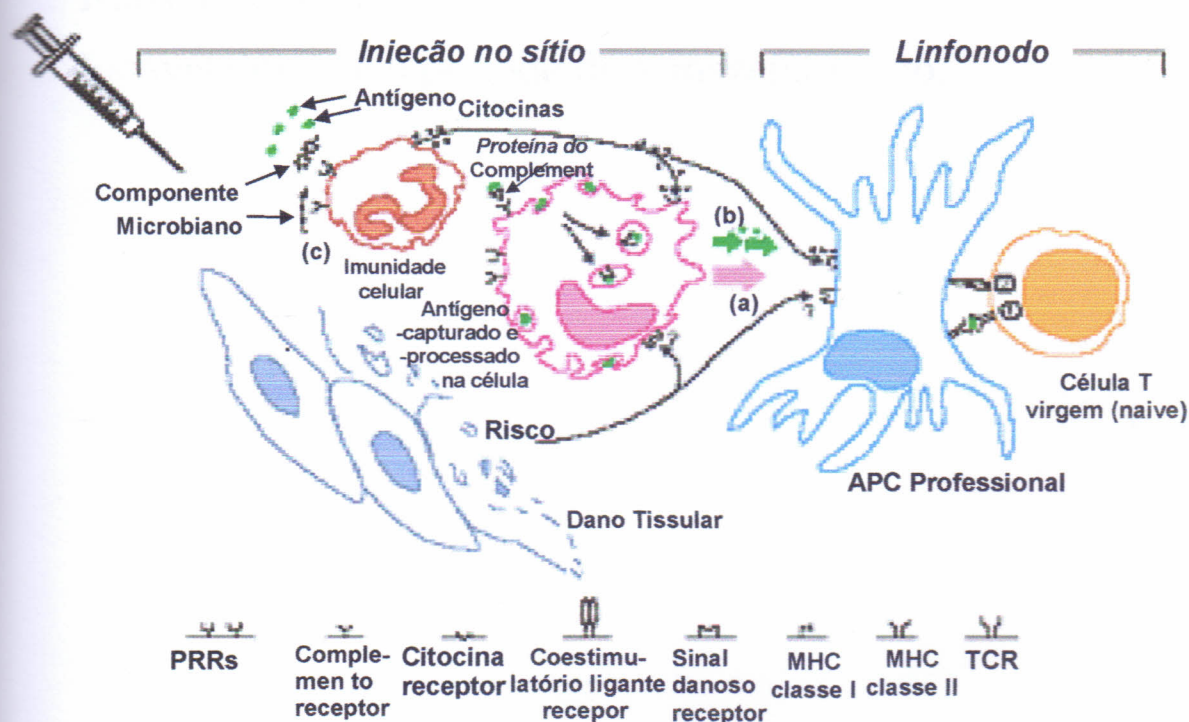


Figura 1 - Visualização de diferentes conceitos de adjuvanticidade

(1998) sugeriram que proteínas do stress em particular as "chaperons" para antígenos aumentavam o aprisionamento e a apresentação das células apresentadoras do antígeno. Os trabalhos de STRAW *et al.*, (1985) e YAMANAKA *et al.*, (1992) mostraram que a necrose de fibras musculares individuais e o edema intramuscular em tecido conjuntivo intersticial estavam associados com um influxo de neutrófilos horas após a vacinação em presença de diferentes adjuvantes, incluindo hidróxido de alumínio, fosfato de cálcio e óleo mineral. Devido a todos estes fatores, a capacidade de causar danos induzindo reações locais no local da injeção pode ser uma propriedade de muitos adjuvantes (Fig. 2).

Figura 2- Requisitos Apropriados a um Adjuvante

Estimulação da resposta humoral e resposta imune celular

Não induz autoimunidade

Não é mutagênico, carcinogênico ou teratogênico

Não é pirogênico

Estável durante o período de armazenamento.

Os adjuvantes podem ainda ser classificados de acordo com sua capacidade de estimular a imunidade inata e adquirida; sendo isto demonstrado por diferenças significantes em seus receptores celulares e mecanismos de ação (Fig. 3).

Figura 3- Adjuvantes da Imunidade Inata e Adquirida

Adjuvantes da imunidade inata

Produtos microbianos (PAMPs) (e.g. cpG-DNA, LPS)

Ligação específica TLRs e PRRs em APCs

Ativação do Fator Nuclear para:

- Produção de citocinas inflamatórias

- Aumento da produção do B7 ligante

- Ativação da imunidade adaptativa

Adjuvantes da imunidade adaptativa

Produtos sintéticos e naturais como as citocinas e saponinas

Alta ligação específica nas células T

Ativação das células T por:

- Sinais coestimulatórios

- Indução de regulação de genes das citocinas

1.1.3- Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação dos adjuvantes depende de numerosos fatores dos quais, muitos ainda permanecem desconhecidos. Segundo SINGH & O'HOGAN (2003), até o momento não está claro nem o que acontece a partir da imunização ativa e sua cascata complexa de respostas, nem mesmo o efeito primário de um adjuvante. Entretanto, se concordarmos com o conceito geográfico de reatividade imune, os antígenos que não conseguem migrar para o linfonodo não induzem respostas imunes; sendo esse mecanismo proposto somente para alguns adjuvantes; particularmente aqueles que possuem um sistema de entrega ("delivery"). MACKAY (1992), BUTCHER & PICKER (1996) mostraram que as células T virgens circulam entre órgãos linfóides secundários, como o baço e linfonodo, através do sangue e dos vasos linfáticos aferentes. De acordo com SCHIJNS (2000), os antígenos (presentes nos órgãos linfóides), a localização do antígeno, a dose e o tempo de apresentação do mesmo são requisitos essenciais na teoria do conceito geográfico da reatividade imune.

Os trabalhos de HARRIS & RONCHESE (1999), ADEREM & EREMIN (2000), AKIRA *et al.*, (2001) e FRAUWIRTH & THOMPSON (2002) mostraram que a caracterização estrutural de diferentes adjuvantes e a identificação de receptores celulares que estão associados a suas atividades (exemplos: "toll like receptors" (TLRs) e os receptores ligantes coestimulatórios) são fundamentados em um melhor entendimento de seu mecanismo de ação no nível molecular. O primeiro mecanismo é a formação de depósito, emulsões e adjuvantes insolúveis (adjuvantes particulados) que estimulam as células apresentadoras de antígenos (APCs), horas após a imunização (SATTHAPORN & EREMIN, 2001), o "targeting" que é o mecanismo pelo qual um complexo antígeno-adjuvante é liberado para as células apresentadoras do antígeno (APCs) e as partículas de adjuvantes ligam-se aos antígenos formando agregados que são englobados por APCs, através de endocitose, para a formação de endossoma (ZAMZE, 2002).

KAWABE & OTHI (1991) e KAARNETY (1994) mostraram que injeções de proteínas antigênicas purificadas em animais causavam rápida proliferação e morte

das células T antígeno-específicas. Conseqüentemente, esse processo de ativação/indução e morte celular (AIDC) é provavelmente importante porque reduz rapidamente a capacidade de ativação das células T efectoras ativadas e também permite a remoção de células T que são respondedoras a antígenos exógenos. Desta maneira há redução do risco de respostas autoimunes. Pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais os adjuvantes aumentam a expectativa de vida das células T ativadas. MITCHELL *et al.*, (2001), conseguiu mostrar que os adjuvantes aumentam a expectativa de sobrevivência das células T ativadas por antígenos, através do aumento da expressão da proteína Bcl-3 nestas células.

De acordo com ALVING (2002), os mecanismos de adjuvantes têm sido esclarecidos por comparações entre diferentes adjuvantes em estudos *in vitro*, em roedores ou em outros animais. Contudo, muitas vezes não é feito o prognóstico de segurança dos efeitos adjuvantes e da eficácia de vacina em humanos. Atualmente vários adjuvantes têm sido avaliados em testes clínicos, VOGEL *et al.*, (1995), organizaram uma lista contendo setenta e cinco adjuvantes onde apenas onze dentre eles foram testados em humanos. Entretanto, atualmente apenas os sais de alumínio e M59 (óleo em água composto de esqualeno, polisorbato 80 (Tween 80) e sobitan trioleato (Span 85)) estão presentes em vacinas licenciadas. Recentemente ENGERS *et al.*, (2003), apresentaram vinte e três adjuvantes que foram avaliados através de testes clínicos pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

A QS-21 é um produto natural purificado da *Quillaja saponaria* que foi utilizado por KENSIL (2003) com diferentes vacinas contra HIV, malária, melanoma e pneumococos. Foi então mostrado que esse adjuvante tinha um perfil de segurança aceitável quando avaliada em testes clínicos. Entre as propriedades desse adjuvante estão a capacidade para potencializar as vacinas associadas às respostas de anticorpos incluindo isotipos de anticorpos Th1 e Th2, a capacidade para estimular a resposta imune celular mediada por subunidade de antígenos e a capacidade para estimular respostas mucosas pelas vias nasal ou oral. Foi também mostrada a importância do domínio acil na ativação das respostas humoral e celular. A QS-21 estimulou a produção de citocinas de culturas de macrófagos de células RAW-264.7 e também estimulou a célula, "natural killer" em Balb/c. A *Quillaja saponaria* pode

formar micelas típicas na presença de colesterol e fosfolipídios chamados complexos imunoestimulantes (ISCOM). As vacinas que eram utilizadas com ISCOM mostraram respostas humoral e celular em diferentes modelos animais e, mais recentemente, em humanos (DRANE & PEARSE, 2003).

REVETS & BAETSELIER (2003), mostraram que a lipoproteína 1 de *P.aeruginosa* estimula as células do sistema imune inato produzindo IL-12 e TNF- α enquanto o OM-174 ("triacil motif"), um adjuvante derivado de lipídio A de *E. coli*, apresentou atividade adjuvante em vários modelos animais de vacinações, induzindo respostas humoral e celular para diferentes antígenos. Na avaliação em testes clínicos foi admitido que o OM-174 seria utilizado pela via intramuscular (DAVIES, 2003).

Os adjuvantes oleosos também foram avaliados e entre eles temos: o Montanide ISA 720 e Montanide ISA 51 contendo surfactantes à base de monoleato monide. Esses adjuvantes têm sido controlados através da presença do ácido graxo (monoleato monide) que é responsável pelo efeito tóxico das emulsões ocasionando reação local (ENGERS, 2003). O MF59 é outro adjuvante oleoso que foi amplamente testado em várias espécies animais apresentando um ótimo perfil de segurança. Além disso, mostrou um aumento significativo da resposta imune a várias subunidades de antígenos, incluindo CMV, HSV, HIV, HCV, HBV e antígenos da influenza. A atividade adjuvante do MF-59 também induziu estimulação de certas citocinas e, diante dos resultados clínicos, o adjuvante MF-59 foi licenciado na Europa para uso em humanos (PODDA, 2003).

Os sais de alumínio também foram licenciados para uso em humanos desde 1930, com um excelente perfil de segurança. Porém, existem divergências em relação ao seu uso em vacinas para humanos. Em 1957, o alume foi licenciado na Inglaterra, enquanto que em 1964, o comitê de controle de doenças infecciosas da Academia de Pediatria dos Estados Unidos autorizou o uso de vacinas com alumínio precipitado em DTP (Toxóide difterial/pertussis) ou em vacinas adsorvidas em hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio. Contudo, as vacinas que usam o alumínio como adjuvante têm mostrado perfil de segurança há mais de uma década.

Entretanto, o efeito do alumínio em vacinas vem sendo associado com diferentes reações locais como eritema, nódulos subcutâneos hipersensibilidade de contato e inflamações granulomatosas. Alguns estudos com o alumínio adsorvido (DTP), mostraram menor número de reações adversas do que o alumínio não adsorvido. Segundo WALLS (1997) & NAGEL *et al.*, (1997) o hidróxido de alumínio induziu migração de eosinófilos no sítio da injeção, aumentou os níveis de anticorpos IgE-específicos que podem favorecer reações alérgicas. Recentemente, VERDIER (2003) descreveu uma lesão histológica observada em uma biópsia de músculo deltóide em um caso de miofascilite macrofágica (MMF). Contudo, a falta de controle apropriado, o número limitado de casos e a relação causal entre o MMF e os sintomas clínicos, o papel do alumínio é ainda controvertido e não foi confirmado por outros grupos de pesquisa. Porém, as principais barreiras para o estudo de uma lesão local no músculo de pessoas vacinadas estão na dor e na cicatrização que não tornam possível as pesquisas em humanos, devido aos aspectos éticos da questão.

Os adjuvantes IFA e CFA são potentes e eficazes, mas devido aos efeitos colaterais não podem ser usados em vacinas humanas. O CFA foi considerado muito tóxico para uso em humano diante da presença do óleo mineral e da presença do *Mycobacterium tuberculosis* inativado que causa granulomas, formação de abscesso e induz também artrite e reações alérgicas. O IFA também é capaz de causar abscessos e formação de granuloma, mas essas reações são menos severas do que aquelas induzidas pelo CFA. Entretanto, foi mostrado que a reatividade é causada pela presença do Arlacel A que contém ácidos graxos livres impuros (ALVING, 2002). SALK (1953) foi o primeiro pesquisador a mostrar que não ocorreram lesões locais com o IFA quando injetado intramuscular antes da imunização subcutânea. Essas observações foram confirmadas com a vacinação antipoliomielite usando o IFA como adjuvante pois as lesões císticas não foram observadas (CUTLER *et al.*, 1962). Dentro desse contexto, o uso do IFA tem ocasionado controvérsias porque a relação/risco benefício pode ser considerada alta quando usadas em algumas vacinas humanas (ALVING, 2002).

A importância do conhecimento de novos adjuvantes e de seus mecanismos de ação é posta em evidência quando se sabe que, atualmente, a nova geração de vacinas, incluindo aquelas nas quais são usadas subunidades de antígenos virais, produzidas por técnica de DNA recombinante, somente darão bons resultados se ministradas com adjuvante seguro, adequado e eficaz. As vacinas com DNA induzem um largo espectro de respostas imunes que incluem a participação de células citolíticas, células T helper e anticorpos. Nesse caso, a resposta imune pode ser modulada por adjuvantes genéticos, na forma de vetores, que expressam determinantes biologicamente ativos (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN, TGF-1, etc.) ou por adjuvantes que facilitam a captação do DNA pelas células (KAWALCZK & ERTL, 1999). Os CpGs (oligo-desoxinucleotides)-DNA, devido a seus efeitos na estimulação imune vêm sendo considerados como excelente adjuvante em vacinas, podendo aumentar a resposta imune humoral e celular antígeno-específica. De acordo com o seu mecanismo temos: a) ativação direta das células B resultando em produção de imunoglobulinas, b) ativação direta de macrófagos e células dendríticas resultando de maturação CD4-dependente seguida de liberação de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, c) "up regulation" de MHC classe II, expressão B7s e CD40 para melhorar a apresentação do antígeno, d) influência da ativação das células CD4+ e CD8+ através do CpG-DNA mediante ativação de APCs e produção de citocinas (IFNs e IL-12).

1.1.4 Emulsões

A emulsão é definida como um sistema heterogêneo que está formado, pelo menos, por um líquido imiscível intimamente disperso em outro na forma de gotículas, cujo diâmetro, em geral, excedem a $0,1\mu$ (LISSANT, 1984). As emulsões clássicas de água em óleo (água é a fase dispersa) ou óleo (O) em água (W) (óleo é a fase dispersa) são abreviadas como W/O e O/W, sendo a outra alternativa W/O/W. Na emulsão de W/O as pequenas gotículas de água são estabilizada por surfactante (monoleato monide) em uma fase de óleo contínua (óleo mineral, esqualeno ou esqualano), ou seja, antígenos solúveis em água podem ser emulsificados com óleo ou como duplas emulsões (W/O/W) e os antígenos lipofílicos com emulsões de O/W

(BECHER, 1965). Essas emulsões de O/W contêm óleos metabolizáveis e possuem excelente perfil de segurança. Na preparação de uma emulsão podemos utilizar os processos mecânicos ou manuais através de seringa. A agitação manual é o método mais simples para obtenção de emulsões sendo bastante utilizado em laboratórios experimentais, onde as formulações são preparadas em pequena escala e se destinam invariavelmente, a serem utilizadas em curto prazo de tempo. Já na produção de emulsões em larga escala, os agitadores adaptam-se a todas as condições de trabalho. Para estabilizar as emulsões os surfactantes são adicionados, sendo eles definidos como compostos que contêm um grupo polar que é hidrofílico e outro grupo polar que é hidrofóbico e uma cadeia de ácido graxo (LISSANT, 1984).

A característica físicoquímica de uma emulsão pode ser avaliada por vários parâmetros: condutividade, viscosidade, teste da gotícula ("Droplet test"), tamanho da partícula e estabilidade em várias temperaturas. O "Droplet test" e a condutividade permitem a identificação do tipo de emulsão (AUCOUTURIER *et al*, 2001). A viscosidade da emulsão é ligada ao surfactante e aos valores do HLB (balanço dos valores do hidrofílico/lipofílico)(SALAGER, 2000). O tamanho da partícula é também um importante parâmetro; sendo influenciado por um adequado sistema de surfactante e o processo de emulsificação. Isto é geralmente identificado quando as emulsões têm partículas de tamanho pequeno e a distribuição homogênea é mais estável. A estabilidade também é um importante parâmetro e quando esses parâmetros são seguidos, as emulsões podem permanecer estáveis por um ou dois anos (AUCOUTURIER, 2003). Contudo, a qualidade ou concentração do antígeno pode influenciar na estabilidade, pois quando a emulsão se desfaz pode ter um impacto na eficiência da formulação. Portanto, os diferentes aspectos dos mecanismos de estabelecimento das emulsões diminuem a liberação dos antígenos e protegem as enzimas proteolíticas diretamente dependendo da estabilidade (AUCOUTURIER, 2003; SALANGER,2000). Porém, elas induzem inflamação e estimulam o recrutamento de APCs favorecendo a captação do antígeno, sendo esse mecanismo explicado pela interação entre o surfactante e a membrana celular. De acordo com GUPTA *et al.*, (1995), os emulsificantes,

surfactantes e imunoestimulantes podem aprisionar o antígeno na superfície do óleo por interações hidrofóbicas.

O primeiro registro do uso de óleo vegetal como imunoadjuvante foi feito por HILLEMANN (1966). O adjuvante consistia de 86% do óleo de amendoim, 10% de Arlacel A (monoleato monide) como emulsificante e 4% de alumínio monosterato como estabilizante. Quando esse adjuvante foi testado em humanos mostrou-se potente, seguro e com menor capacidade adjuvante do que a do FIA. Embora esse adjuvante tenha sido licenciado em alguns países, seu uso foi suspenso devido a reatividade em humanos com alguns lotes de vacinas. Porém, MURRAY (1972), mostrou que o Arlacel A era um co-carcinogênico em camundongos machos das linhagens Webster e Swiss. Entretanto, outra preparação usando óleo de amendoim altamente refinado emulsificado em vacina de arbovirus aquosa com glicerol e lecitina foi também desenvolvida por KIMURA *et al.*, (1978). A vacina mostrou aumento no nível de anticorpos e também induziu imunidade protetora em vários animais. Essa composição com óleo de amendoim, glicerol e lecitina foi descrita como não reativa em tecidos e diferentemente do Arlacel A, o glicerol e a lecitina são constituintes normalmente metabolizados pelo hospedeiro (EDELMAN *et al.*, 1980). Devido a todos esses fatores, uma larga variedade de óleos vem sendo avaliada e entre eles podemos citar a parafina, óleos minerais e os óleos de plantas como o de amendoim e o de soja (CHANG *et al.*, 1998).

As vacinas oleosas são utilizadas com sucesso em programas de controle de doenças na América do Sul (MELLO, 1982 & PATIL, 2002). Os ácidos graxos insaturados têm sido citados, em experiências *in vivo* e *in vitro*, como agentes inflamatórios e imunorreguladores e eles são importantes na manutenção das estruturais da membrana celular, apresentando um papel preponderante na determinação de atividades enzimáticas ligadas à membrana e à expressão de receptores. Os mecanismos de ação dos ácidos graxos como imunorreguladores parecem ser exercidos através das células-T (ZURIER, 1993).

1.2- Caracterização físicoquímica dos óleos de soja, milho e oliva.

O óleo de soja refinado apresenta uma cor ligeiramente amarelada e um sabor característico. O teor de óleo da semente varia de 17 a 22% e o da proteína 40-45%, sendo esses teores influenciados pelas condições climáticas e de solo. Apesar do seu elevado teor de tocoferóis (até 1200 ppm) a estabilidade do óleo refinado é limitada, devido ao grande conteúdo de ácido linolênico. O óleo de soja pode ser detectado em outros óleos pelo seu teor de ácidos graxos, tocoferol e esterol. O óleo de milho contém 3,5-5% de óleo, sendo 80% distribuído no gérmen e 20% no endosperma. Já o óleo de oliva apresenta composição idêntica de óleo na polpa e na semente, sendo sua coloração amarelo esverdeada e torna-se turvo abaixo de -5°C (ROJO *et al*, 1987).

Em relação à composição de ácidos graxos (MORETO, 1998) e o índice de iodo (io), os óleos de soja, milho e oliva apresentam as características indicadas na Tabela 2.

Tabela 2- Caracterização Química dos Óleos de Milho, Soja e Oliva

ÓLEO	Iodo No.	Ácido Mirístico C-14 (%)	Ácido Palmítico C-16 (%)	Ácido Estearico C-18 (%)	Ácido Palmitoleico C-16 (%)	Ácido Oléico C-18 (%)	Poli-Insaturado C-18 (%)	Poli-insaturado >C-18 (%)
Oliva	80-88	-	7	2	2	85	5	-
Milho	110-130	1	10	3	-	50	34	-
Soja	120-135	-	10	2	-	29	57	1

Esses óleos vegetais são comestíveis e são extraídos de várias espécies de plantas. Muitas das sementes usadas para produzir óleos vegetais contêm proteínas

que são altamente alergênicas (CREVEL *et al.*, 2000). O refinamento do óleo envolve uma série de processo e o seu objetivo é remover componentes indesejáveis (proteínas, carboidratos, pigmentos, traços metálicos, etc.) sem afetar significativamente a concentração de compostos desejáveis como vitaminas, ácidos graxos poliinsaturados e sem perda dos principais componentes glicéricos.

Os óleos de oliva virgens e refinados diferem em pequenas quantidades em relação à composição de ácidos graxos, sendo o ácido oléico o componente principal (OWEN *et al.*, 2000). Além disso, a proporção de ácido linoléico tende a ser mais elevada nos óleos que provêm das regiões mediterrâneas mais quentes. A alta estabilidade do óleo de oliva é particularmente devida à concentração de ácido oléico que é menos favorável à oxidação do que a dos ácidos linoléico e linolênico. Além disso, os compostos fenólicos (tocoferóis) e vitamina E contribuem para essa estabilidade. De acordo com TENDERDY & LACETERA (1991), as vitaminas A e E são imunopotenciadores porque elas protegem as células sensíveis, em estado de proliferação rápida, do sistema imune dos danos oxidativos e aumentam a interação celular por alteração da membrana.

1.3- Imunidade inata e Imunidade adquirida

A resposta imune vem sendo descrita sob duas formas reconhecidas como imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade adaptativa é mediada por distribuição clonal de linfócitos T e B sendo caracterizada por especificidade e memória, enquanto a imunidade inata é descrita como uma resposta imune não específica com englobamento e digestão de microorganismo e substâncias estranhas por macrófagos e leucócitos. Contudo, a definição de imunidade inata atualmente vem sofrendo modificação, passando a ser considerada como capaz de ter uma certa especificidade de distinguir os patógenos do patrimônio ("self", próprio) do hospedeiro apresentando moléculas e receptores que reconhecem padrões moleculares conservados na maioria dos microorganismos (MALHOTRA *et al.*, 2000). Esse processo é rápido, pois é ativado do mesmo modo por um grande espectro de patógenos microbianos que agem antes da resposta imune antígeno-

específica (MALHOTRA *et al.*, 2000; MEDZHITOV & JANEWAY, 2000) . Segundo ADEREM & ULEVITCH (2000), a ativação da resposta imune inata vem sendo admitida como um elo indispensável à ativação da imunidade adquirida. Além disso, a ativação da resposta imune inata regula a expressão de moléculas coestimulatórias e citocinas efetoras, que fornece o sinal necessário para regular a ativação de células T e B, e desde modo o sistema imune adaptativo (McGUINNESS *et al.*, 2003).

Recentemente, SCHNARE *et al.*, (2001), mostraram que os receptores "Toll-like" têm um papel essencial na imunidade inata controlando a ativação da resposta imune adaptativa. Alguns adjuvantes como o CFA, confere imunogenicidade a antígenos não imunogênicos porque estimulam os receptores "Toll-like". Estes receptores são classificados como do tipo 1 e são proteínas transmembranares evolutivamente conservadas em insetos e humanos. Os membros da família de receptores "Toll-like Receptors" (TLR) são expressos diferencialmente nas células do sistema imune e parecem responder a diferentes estímulos (SCHNARE *et al.*, 2001; MEDZHITOV, 2001).

A imunidade adaptativa é influenciada por uma geração de linfócitos reconhecidos como T-auxiliares (T-helper), resultando na produção de citocinas efetoras (Fig.4). As células T-virgens, quando estimuladas por antígenos reconhecidos pelas APCs, diferenciam-se em duas populações de células: Th1 e Th2, favorecendo principalmente a imunidade celular e a imunidade humoral, respectivamente. A participação de citocinas e diferentes moléculas coestimulatórias sinalizam para a expansão clonal de células T antígeno-específicas. A apresentação do antígeno na ausência de coestimulação conduz a anergia das células T, enquanto que moléculas coestimulatórias sozinhas não ativam as células T antígeno-específicas. Entretanto, para induzir imunogenicidade efetiva, esses estímulos devem ser transmitidos simultaneamente por APCs às células T (AKIRA *et al.*, 2001).

Os adjuvantes estimulam APCs que sinalizam favorecendo a imunidade e aumentando a atividade da apresentação do antígeno e induzindo produção de

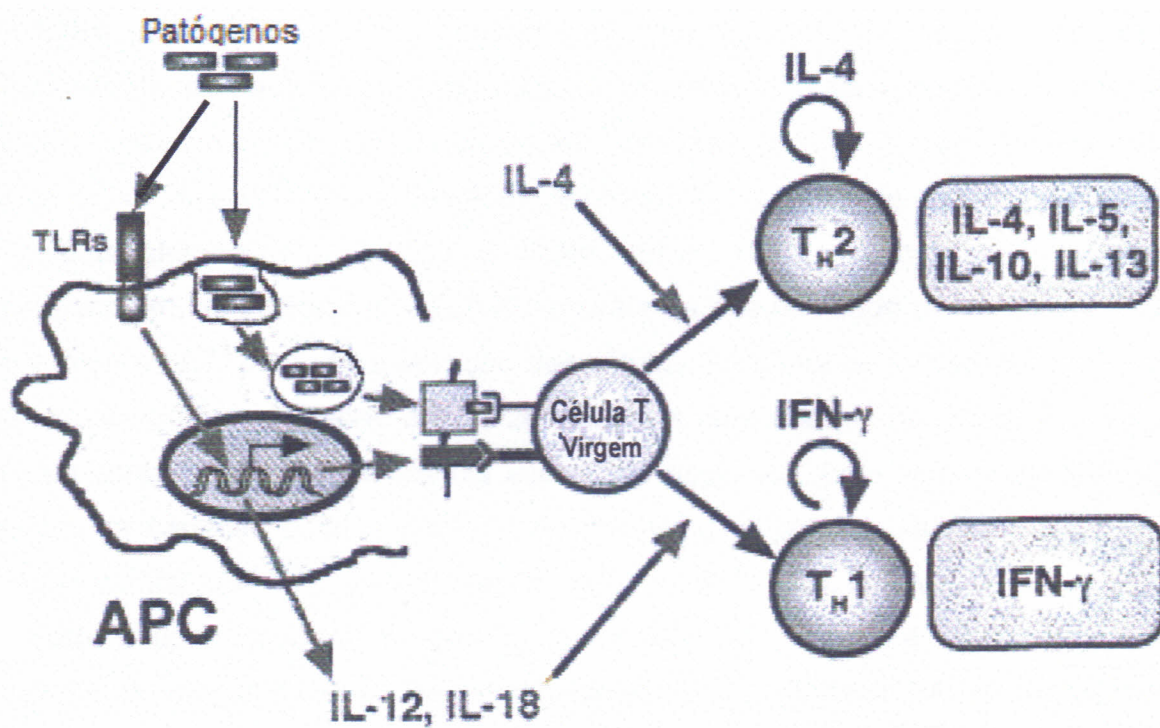


Figura 4 – Regulação da célula T por TLRs em APCs

citocinas e expressão de moléculas coestimulatórias em APCs (SHIZUO *et al.*, 2001). Na ativação das células T (CD4⁺ e CD8⁺) os antígenos que estão presentes nas APCs são reconhecidos pelos complexos MHC da classe II ou I, respectivamente. O processo mediado por TCR para ativação e produção de células efectoras é capaz de secretar citocinas (PARKIN & COHEN, 2001). Os sinais requeridos para a ativação das células T são: interação do TCR com o complexo antígeno/MHC e o outro é a coestimulação de sinais liberados por B7-1 ou B7-2-ligantes, presentes nas APC. Os sinais emitidos por B7-1 preferencialmente favorecem o desenvolvimento de células efectoras Th1 e os sinais emitidos por B7-2, de células efectoras Th2 (HARIS & RONCHESE, 1999). As células T ativadas expressam um novo receptor, CTLA-4 (receptor de alta afinidade para molécula B7) que se liga ao B7, parando a ativação das células T. A falta de fornecimento de um sinal coestimulatório baseado em CD28 conduz a uma anergia da célula T o que é também conhecido como "tolerância imune" ou apoptose. Este sinal coestimulador fornece um caminho para a estimulação imunológica por adjuvantes que podem substituir os ligantes B7-1 ou B7-2 (MITCHELL *et al.*, 2001). A ativação das células T produz 2 tipos maiores de células T-efectoras: Th (helper) e Tc (citotóxicas), derivadas de células CD4 e CD8, respectivamente. As células CD4 interagem com APCs que possuem os complexos antigênicos do MHC-II para produzir as células Th1 ou Th2. Esta ativação mostra-se dependente da origem da ativação de células dendríticas que interagem com CD4 (SATTHAPORN & EREMIN, 2001). As células Th1 produzem citocinas pro-inflamatórias, como o IFN- γ , IL-2, TNF- α , estimulação e produção de linfócitos T citotóxicos enquanto as células Th2 produzem IL-4 e IL-10, favorecendo a produção de anticorpos dependentes da classe e também inibem as células Th2 de entrarem na via Th1 (MURPHY & REINER, 2002).

Embora diferentes adjuvantes possam induzir níveis comparáveis de anticorpos funcionais, os respectivos perfis de citocinas e isotipos de anticorpos são diferenciados (MITCHEL *et al.*, 2001). Em certas situações, o tipo de resposta induzida (Th1 ou Th2), tem sido de impacto significativo na eficácia protetora de uma vacina. Diferentes adjuvantes favorecem diferentes tipos de resposta o que pode proporcionar algum grau de orientação na seleção de adjuvantes. Contudo, a

escolha do adjuvante é complicada por restrição comercial, toxicidade e disponibilidade.

As células T-CD8⁺ reconhecem antígenos que são processados endogenamente, apresentados por células e expressos em moléculas do MHC da classe I. Essas células ativadas produzem citocinas, como IFN- γ e TNF- α e diferenciam-se em efetor citolítico (CTL + CD8). O efeito citolítico é mediado pela liberação de grânulos que contêm perforinas e granzima. A atividade citotóxica pode também ser expressa através do ligante Fas que induz a morte celular. O Fas e o seu ligante são normalmente induzidos durante uma resposta imune adaptativa (MARCIONI, 2003).

1.4 - Reação inflamatória

A inflamação é fundamentalmente uma resposta de proteção, cujo objetivo é livrar o organismo tanto da causa inicial da agressão celular (ex., microorganismos, toxinas) quanto das células e tecidos necróticos, conseqüências dessa agressão. (SEDGWICK & WILOUGHBY, 1985).

O processo inflamatório é bastante variado e extremamente complexo, caracterizando-se por um aumento local do fluxo sanguíneo, exsudação de proteínas plasmáticas, migração e ativação de leucócitos, acompanhados por efeitos gerais (ILBAÑEZ *et al.*, 1992; CONTRAN *et al.*, 1999). Em resposta a um processo inflamatório local, desencadeado por agente patogênico ou substância estranha, leucócitos são recrutados para o sítio inflamatório.

A primeira fase da reação inflamatória é denominada de fase aguda sendo que, dependendo do estímulo ser ou não ser persistente, esta reação pode tornar-se crônica, podendo, muitas vezes, ser prejudicial ao organismo (BAUMAN *et al.*, 1994). A mobilização adequada dos leucócitos, da microcirculação para o foco inflamatório, é também uma etapa fundamental para a defesa do organismo contra os agentes lesivos.

Muitas células envolvidas na resposta inflamatória já estão presentes, tais como as células endoteliais, mastócitos e células mononucleares residentes, enquanto que outras chegam ao foco inflamatório provenientes do sangue, como é o caso dos leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e as células mononucleares (monócitos e linfócitos) (SEDGWICK *et al.*, 1985)

O tipo de leucócitos que migra varia com a idade da lesão inflamatória e com o tipo de estímulo. Os neutrófilos são as primeiras células que chegam ao foco inflamatório, sendo predominante encontrados no exsudato formado nos estágios iniciais da maioria dos processos inflamatórios. A principal função dos neutrófilos é a fagocitose e essas células possuem grânulos citoplasmáticos que contém hidrolases ácidas, mieloperoxidase, proteínas catiônicas, lisosima e lactoferrina que, somados aos produtos derivados do metabolismo do oxigênio têm um papel antibacteriano importante (BARBIOR *et al.*, 1973; BROWN & LINDEBERG, 1996).

Os macrófagos secretam uma grande variedade de substâncias biologicamente ativas que participam da reação inflamatória e imune. Entre os produtos liberados destacam-se os metabolitos do ácido araquidônico, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, fatores medulares, tais como o fator estimulador de colônias de granulócitos/monócitos (GM-CSF), fatores regulatórios da inflamação, como glicocorticóides, componentes do sistema complemento, C5a e C3b, entre outros (NATHAN, 1987). Essas células são responsáveis pela iniciação da mobilização de neutrófilos, da circulação para as regiões de dano tissular, e também pelo desencadeamento de outros eventos inflamatórios (CUNHA & FERREIRA, 1986). Deve-se ressaltar ainda, que os macrófagos são encontrados em quase todos os tecidos e fluidos do organismo (EDELSON, 1980).

Entre os granulócitos polimorfonucleares destacam-se os eosinófilos, que são atraídos ao foco inflamatório por fatores quimiotáticos (ECF-A) e interleucina 5 (IL-5) produzidos por mastócitos e linfócitos. Eles são importantes nos fenômenos inflamatórios de origem alérgica ou parasitária (SIMON, 2001).

Os eventos celulares envolvem principalmente a migração de leucócitos e a liberação de substâncias ativas para o local lesado. Essa migração leucocitária é dotada de fina especificidade, isto é, os neutrófilos ocorrem seletivamente ao sítio da inflamação aguda. Entretanto, a migração dos linfócitos é seletiva associada a um padrão de recirculação o qual está relacionado com sua diferenciação e ativação (IMHOF & DUNAN, 1995).

Os eventos bioquímicos da ativação de leucócitos são responsáveis pela liberação de produtos biologicamente ativos, tais como: metabólitos do ácido araquidônico, citocinas, aminas vasoativas, polipeptídeos vasoativos e produtos do metabolismo oxidativo dentre os quais estão incluídos os derivados do oxigênio: ânion hidroxil (OH^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido (O_2^-) que, quando em excesso, podem causar danos teciduais e endoteliais nos organismos hospedeiros (REMICK & VILLARETE, 1996). Os danos causados pelas espécies reativas do oxigênio promovem o aumento da expressão de mediadores (citocinas, quimiocinas) e adesão celular, amplificando a cascata da resposta inflamatória, além do aumento da permeabilidade vascular (FANTONE & WARD, 1988).

A migração de leucócitos ocorre independentemente do aumento da permeabilidade vascular na inflamação aguda. Este processo pode ser dividido nas seguintes etapas: (1) intraluminais: marginação, rolagem e adesão; (2) diapedese e (3) migração nos tecidos intersticiais na direção do estímulo quimiotático (ROSSI & HELLWELL, 1994) (Fig 5).

No sangue que está fluindo normalmente, os eritrócitos e os leucócitos dentro dos microvasos estão confinados à coluna axial central, deixando uma camada de plasma relativamente livre de células em contato com a parede vascular. À medida que ocorre a estase, em decorrência do aumento da permeabilidade vascular, os leucócitos parecem sair da coluna central indo margear a superfície endotelial. Posteriormente, os leucócitos isolados e, em seguida, fileiras de leucócitos deslocam-se lentamente ao longo do endotélio e a ele aderem transitoriamente, em um processo denominado de rolagem, interrompendo finalmente seu trajeto para aderir firmemente em outro sítio. Com o tempo, o endotélio pode ser praticamente

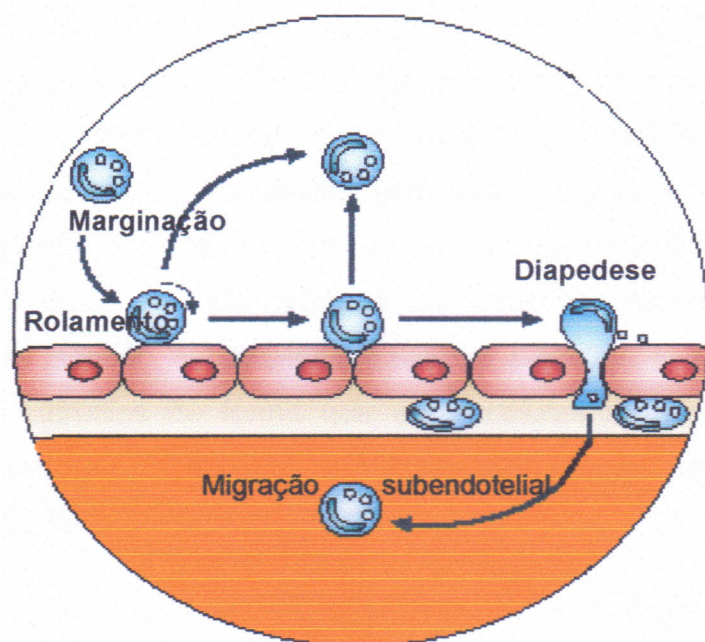


Figura 5 - Representação das etapas da migração celular. Fonte: SALVEMINI *et al.*, (2002).

recoberto por leucócitos. Após a fase de adesão firme, o leucócito insere pseudopodes nas junções das células endoteliais e comprime-se através das junções em direção ao estímulo quimiotático (BUTCHER, 1991).

As moléculas de adesão que são expressas na superfície dos leucócitos e do endotélio são classificadas de acordo com sua estrutura química e podem ser divididas em três grandes famílias: as selectinas, a família das integrinas, e os contra-receptores pertencentes à super famílias das imunoglobulinas (IMHOF & DUNON, 1995; GAHMBERG *et al.*, 1999). Quando os tecidos são lesados, essas moléculas fazem com que as células endoteliais expressem uma glicoproteína chamada de selectina P. Esta molécula de adesão celular pode ligar-se às cadeias laterais de carboidrato de uma proteína de superfície neutrofílica chamada de selectina L. Essa adesão é transitória devido a selectina L sair rapidamente da superfície dos neutrófilos de forma que estas células atrasam-se gradualmente, rolando na superfície do endotélio à medida que perdem velocidade até parar completamente (IMHOF & DUNON, 1997).

Durante essa fase, os leucócitos interagem com outros receptores presentes no endotélio os quais, juntamente com o estímulo de mediadores inflamatórios, ativam as integrinas presentes na sua superfície, tornando-as funcionais. As integrinas, uma vez ativadas, medeiam uma adesão mais intensa dos leucócitos ao endotélio. Essa fase é mediada pelos pares de proteínas VLA-4/VCAM-1, LFA-1/ICAM-2 e Mac-1/ICAM-1 (IMHOF & DUNON, 1995; SPRINGER, 1995).

Uma vez firmemente aderidos, os leucócitos migram através do endotélio, sendo este um rápido evento, pois dentre de poucos ele alcança a membrana basal subendotelial. A transmigração é um evento de via única uma vez que os leucócitos são capturados pela matriz extracelular da membrana basal (HOURIRAN *et al.*, 1993).

Durante o processo inflamatório, mediadores são liberados e entre estes se destaca o óxido nítrico (NO), que é produzido pela ação da enzima óxido nítrico sintase através de imunoestimulação. Este mediador é produzido por macrófagos, hepatócitos e células renais estimuladas pela presença de lipopolissacarídeos (LPS),

FNT- α , IL-1 ou interferon gama (IFN- γ). O NO atua como uma molécula regulatória e de defesa, com atividade homeostática (KUO & SCHROEDER, 1995).

Além da participação das moléculas de adesão celular, as citocinas também exercem efeitos locais na reação inflamatória. A IL-1 e o TNF exercem papéis importantes na ativação de neutrófilos aumentando a expressão de moléculas de adesão nos neutrófilos e no endotélio (BAUMANN & GAULDIE, 1994).

Os radicais livres são espécies químicas que possuem um par de elétrons desemparelhado e são produtos do metabolismo celular de organismos aeróbios gerados durante o processo respiratório celular quando ocorre desequilíbrio entre o sistema antioxidante natural e sua formação (FARBER, 1982). Os radicais livres podem induzir peroxidação dos lipídios de membranas biológicas (HARMAN, 1969) num processo denominado estresse oxidativo (FARBER, 1982).

A geração de radicais livres tem sido associada com inúmeros processos patológicos como o envelhecimento celular, a morte de agentes patogênicos por células fagocitárias e aos danos causados no processo inflamatório, câncer, cirrose, arteriosclerose dentre outros (HALLIWEL *et al.*, 1994). Essa associação deve-se, principalmente, à insaturação da dupla ligação (peroxidação) dos ácidos graxos dos lipídios de membrana e de organelas, causada pelos radicais livres do oxigênio (KNIGHT, 1995; LUBEC, 1996).

Os organismos desenvolveram sistemas de defesa contra os danos celulares causados por esses produtos reativos. Os radicais livres são instáveis e, geralmente, suas concentrações decaem espontaneamente. Mesmo assim, inúmeros processos enzimáticos e não enzimáticos contribuem para inativação dos radicais livres. Entre eles estão: os agentes antioxidantes (vitaminas E, A e C), íons ferro e cobre (proteínas transportadoras) e enzimas (catalase, superóxido dismutase e a glutathiona peroxidase) (NIKI *et al.*, 1984). Sabe-se que indivíduos que consomem dietas ricas em substâncias antioxidantes possuem maiores concentrações das enzimas antioxidativas citadas acima e menores níveis plasmáticos de peróxidos lipídicos (MANJARI, 2000).

O NO é um gás com massa molecular de 30 Da, o qual se difunde livremente através de membranas celulares e tem meia vida de poucos segundos (MACMICKING *et al.*, 1997). O NO é o produto final da oxidação do nitrogênio guanidino da L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). As isoformas da NOS são classificadas de acordo com o tecido de origem e com suas propriedades funcionais e estruturais em NOS constitutiva neuronal (NOS1 ou NOSn), NOS constitucional endotelial (NOS3 ou NOSe) e NOS indutível (NOS2 ou NOSi). Sabe-se atualmente que essas isoformas estão distribuídas em um largo espectro de células e tecidos. Além disso, uma mesma célula pode expressar mais de uma isoforma (RADOMSKI *et al.*, 1990; SUSCHEK *et al.*, 1993; MEHTA *et al.*, 1995). A NOSn e a NOSe são ativadas por um breve e transitório influxo de cálcio que mantém a ligação de calmodulina (NATHAN, 1992). A NOSi é mediadora de algumas das ações citotóxicas de macrófagos ativados, e quando expressa na musculatura lisa vascular, endotélio e/ou fígado, pode desempenhar um papel chave no choque séptico (KILBOURN *et al.*, 1990; CLARK *et al.*, 2001). A NOSi pode ser induzida por citocinas como FNT- α , INF- γ e LPS (STUERH *et al.*, 1991)

O NO atua como mensageiro intracelular em muitos órgãos de mamíferos, participando da homeostase, neurotransmissão e defesa microbiana (NATHAN, 1992). Estudos recentes têm demonstrado que o NO participa de um mecanismo de defesa primário inespecífico contra protozoários (PANARO *et al.*, 2001).

Os efeitos da produção de NO variam de acordo com o tipo de célula produtora de NO, com a NOS envolvida e a quantidade de NO liberada, no local da inflamação. Pequenas quantidades de NO protegem os tecidos por inibição da proliferação de linfócitos T, limitando a adesão e a migração neutrofílica, mantendo a perfusão tecidual, através da vasodilatação e dos efeitos anti-plaquetários (KOSHLAND, 1992). Esses efeitos benéficos ocorrem, principalmente, com o NO produzido pela NOS constitutiva. Por outro lado, quando o NO é produzido em grandes quantidades há uma marcante citotoxicidade por inibição da respiração mitocondrial, induzindo alterações no DNA. O NO produzido por macrófagos e células polimorfonucleares, contendo radicais livres, contribui para a gênese de compostos citotóxicos como o peróxido nítrico (KOLB & KOLB-BACHOFEN, 1998).

O NO também tem função na imunidade específica atuando na regulação do balanceamento entre linfócitos Th1 e Th2, inibindo preferencialmente a diferenciação do linfócito Th1 e induzindo a produção de interleucina 4 (IL-4) por células Th2, promovendo a resposta por Th2 (KOLB & KOLB-BACHOFEN; 1998; BOGDAN *et al*, 2000).

2- OBJETIVO

Objetivo geral: Caracterizar os óleos de oliva, soja e milho, analisar a capacidade imunoadjuvante e inflamatória dos mesmos, tentando correlacionar a atividade inflamatória (resposta imune inata) com a atividade imunoadjuvante (resposta imune adaptativa) em camundongos imunizados por via subcutânea com ovalbumina.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- MATERIAS

3.1.1- Animais

Camundongos "swiss" (fêmeas, com idade com 2 meses de idade) e ratos Wistar adultos, machos mantidos no Biotério Central da Universidade Federal do Ceará foram utilizados.

3.1.2- Óleos

Foram usados óleos comestíveis e de procedência Sigma de soja (Liza), milho (Liza) e oliva (Gallo) e o óleo mineral Marcol 52 (Exxon, França).

Todos os demais reagentes foram de graus analíticos.

3.2- MÉTODOS

3.2.1- Estudo da atividade antioxidante dos óleos vegetais

Os óleos vegetais (10 g) foram extraídos duas vezes com 2 mL de metanol sob agitação em vortex 5000 rpm, 2 min. Após a agitação os extratos foram centrifugados a 5000 rpm por 30 min (Figura 6). Alíquotas (duplicata) de 0.5 mL foram adicionadas a tubos "eppendorf", o solvente foi removido em atmosfera de nitrogênio e os extratos foram dissolvidos em solução de tampão fosfato (1,0 mL). Alíquotas de 10 µL de uma diluição 1:5 em NH_4SO_4 (3,20 mol/L) da enzima xantinaoxidase, foram adicionadas para iniciar a reação. Os tubos foram incubados a 37°C por 3 horas até completar a reação (Figura 7). Após a incubação, 20 µL da mistura reacional foi analisada por HPLC. A quantificação dos difenóis (Ácidos 2,5-dihidroxibenzóico e 2,3-dihidroxibenzóico) produzidos pelo ataque do radical hidroxila (OH) no ácido salicílico foi determinado por curva padrão. A hidroxilação da

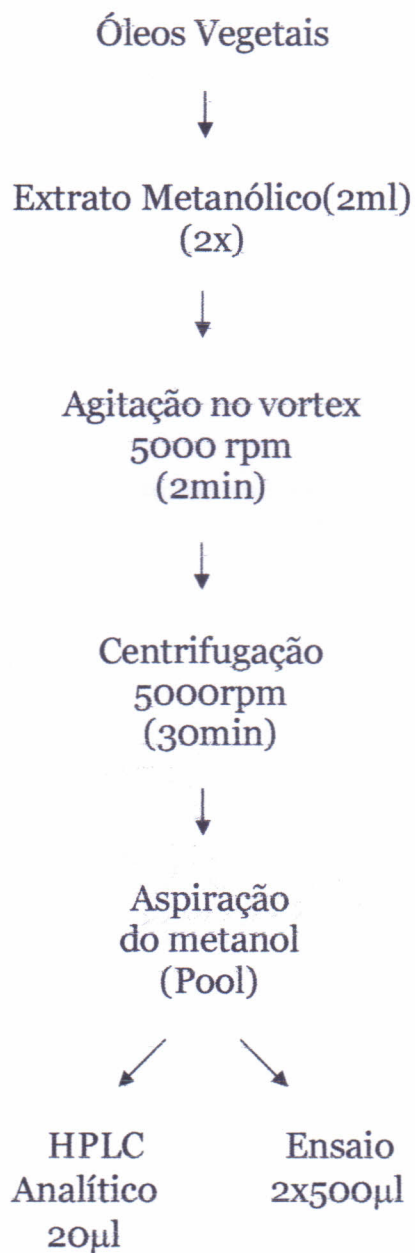


Figura 6 - Protocolo de extração dos compostos fenólicos dos óleos vegetais

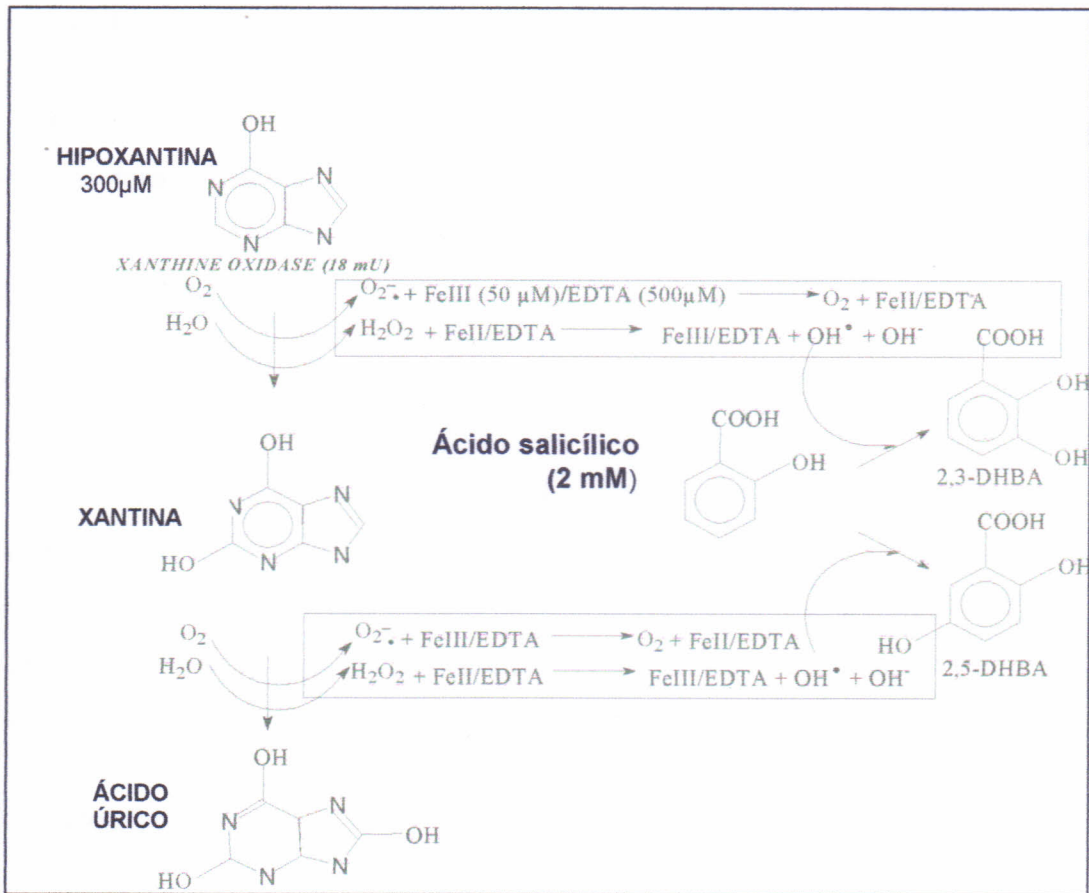


Figura 7 – Esquema da geração de espécie reativa de oxigênio no sistema de Hipoxantina/Xantina Oxidase

hipoxantina (ácido úrico) foi monitorada a 278 nm, enquanto que a hidroxilação no ácido salicílico foi monitorada a 325nm (OWEN *et al.*, 2000).

3.2.2- Análise microbiológica e teste de rancidez oxidativa dos óleos vegetais comestíveis

As análises microbiológicas e o teste de rancidez oxidativa dos óleos vegetais comerciais foram realizados no Laboratório de Microbiologia e no Laboratório de Frutos e Hortaliças do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará.

3.2.3- Preparação das Emulsões

A proteína usada como antígeno foi a ovalbumina (fração V-Sigma) dissolvida em solução de NaCl 0,15 M para chegar à concentração de 0,05 µg/ µL foi emulsionada com os diferentes óleos nas proporções de 1:1 sendo a emulsão feita manualmente, com a ajuda de seringa. A emulsão foi considerada adequada quando, gotejada em água, não perdia sua forma original (' Droplet test').

3.2.4- "Droplet test"

As emulsões dos óleos vegetais foram também avaliadas pelo "Droplet test", isto é, pela formação da gota seguida no intervalo de tempo de 15 a 25 minutos (FILES & CHEN, 2003).

3.2.5- Imunização por Via Subcutânea

Grupos de 5 camundongos "swiss", fêmeas com idade de 2 meses, foram imunizados por via subcutânea, na região dorsal, com 10 µg de ovalbumina, associada ou não a Al(OH)₃ e às diferentes emulsões oleosas: óleo mineral, Marcol 52 e óleos vegetais comerciais e de procedência Sigma não - de soja, milho e oliva totalizando um volume final de 0,2 mL de emulsão.

3.2.6- Esquema de Imunização

Os grupos de 10 camundongos imunizados com o antígeno nas diversas emulsões foram sangrados pelo plexo retro orbital com 0, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 e 77 dias após a imunização inicial. Nos dias 14 e 35 após a imunização, foram aplicados reforços nas mesmas condições da imunização inicial.

3.2.7- Grupos Experimentais

Grupo SAL: animais injetados com 0,2 mL de NaCl 0,15M.

Grupo OVA: Controle - animais imunizados com 10 µg de ovalbumina.

Grupo MAR-OVA: Animais imunizados com 10 µg de ovalbumina + Marcol.

Grupo ALU-OVA: Animais imunizados com 10 µg de ovalbumina + Al(OH)₃.

Grupo CFA1-OVA: Animais imunizados com 10 µg de ovalbumina em solução salina + adjuvante de Freund Completo.

Grupo CFA2-OVA: Animais imunizados com 10 µg de ovalbumina em solução salina + adjuvante de Freund Incompleto.

Grupo OOS-OVA: Animais imunizados com 10 µg de ovalbumina em solução salina emulsionada em óleo de oliva de procedência Sigma.

Grupo OOC-OVA: Animais imunizados com 10 µg de ovalbumina em solução salina emulsionada em óleo de oliva comercial.

Grupo OMS-OVA: Animais imunizados com 10 µg de ovalbumina em solução salina emulsionada em óleo de milho de procedência Sigma.

Grupo OMC-OVA: Animais imunizados com 10 µg de ovalbumina em solução salina emulsionada em óleo de milho comercial.

Grupo OSS-OVA: Animais imunizados com 10 µg de ovalbumina em solução salina emulsionada em óleo de soja de procedência Sigma.

Grupo OLP-OVA: Animais imunizados com 10 µg de ovalbumina em solução salina emulsionada em óleo de soja comercial.

3.2.8- Obtenção de soros

As amostras de sangue foram coletadas com pipetas Pasteur, em diferentes dias (0, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 e 77 dias após a imunização inicial) por punção no plexo retro-orbital. O sangue foi deixado em repouso durante 1 hora à temperatura ambiente para que houvesse retração do coágulo e foi centrifugado a 2.500 rpm (Centrífuga Clínica) por 5 minutos, para obtenção de um soro límpido livre de hemácias. Os soros foram distribuídos em eppendorfs devidamente etiquetados e armazenados a -20°C até o momento da utilização.

3.2.9-Teste de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

O título das Imunoglobulinas das classes IgG (1, 2a, 2b e G3), IgA e IgM foi identificado globalmente através de técnica imunoenzimática de ELISA (BALKWILL, 2000).

As placas (Nunc Immuno Plates-Polysorp) foram tratadas com ovalbumina (15 g de proteína/ml) e incubadas à 4 °C por 18 horas. Após o período de aderência do antígeno à placa, foi feita lavagem dos poços (5 vezes) com PBS-Tween-20 0,05%. As placas foram bloqueadas com PBS-Molico 5%, envolvidas com papel parafilm, incubadas à 37 °C por 60 minutos; e posteriormente lavadas (5 vezes) com PBS-Tween 20 0,05%. As placas foram então incubadas com diluições dos soros à 37 °C durante 120 minutos (período de reação), utilizando-se os seguintes controles: soro de título previamente determinado (controle positivo), soro sem anticorpos específicos (controle negativo) e solução bloqueadora (branco). Após o período de

R13838803

reação, foi feita nova lavagem, como descrito anteriormente. As placas foram incubadas com o conjugado DAKO-P260 na diluição de 1:1000 a 37 °C por 60 minutos, seguindo-se nova lavagem. Adicionou-se então o substrato cromógeno o-Phenylenediamine Dihydrochloride (OPD), deixando-se as placas envolvidas com papel alumínio a 25 °C por 30 minutos, sendo a reação interrompida com H₂SO₄ 2N. Em seguida, as placas foram lidas a 492nm em um leitor de placas de ELISA, Biotecel.

As diluições dos soros foram seriadas de 1:638 a 1:10000. Os resultados foram expressos em escores de ELISA (ELISA*), que representam a soma das absorbâncias das 5 diluições seriadas, multiplicadas por 1000 (VERDOLIN *et al.*, 2001).

3.2.10- Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA)

A quantificação de anticorpos dos tipos IgE presente no soro dos camundongos foi realizada através de reações de anafilaxia cutânea passiva (PCA), como foi descrito por OVARY (1952) e modificada por MOTA & WONG (1969). O título de PCA é definido como o logaritmo na base 2 do inverso da diluição máxima do soro (D_{max}) capaz de dar uma reação positiva. ($\log_2 \times 1/D_{\max}$).

As determinações dos títulos de anticorpos do tipo IgE foram feitas em ratos Wistar machos adultos. A pele da região dorsal dos animais foi raspada sob leve anestesia com halothano e as diluições dos soros, em volumes de 100 µl foram injetadas intradermicamente em pontos previamente marcados. Após um período de latência de 18 a 22 horas, 1 ml de azul de Evans a 0,5% em solução salina contendo o antígeno específico, a ovalbumina (1 mg/mL) foi injetado na veia peniana do animal. Após 30 minutos, os ratos foram sacrificados com halothano e a pele foi dissecada para leitura da reação através das manchas azuladas provocadas por extravasamento do corante nos locais das aplicações dos soros. Cada teste de PCA foi analisado em comparação a um controle com título de anticorpos conhecido, previamente determinado, sendo os resultados normalizados nas diversas repetições, de acordo com o título do controle.

3.2.11- Modelo da Bolsa de Ar Subcutânea (BAS)

A pele do dorso dos 6 animais de cada grupo foi previamente depilada e no local foi aplicada uma injeção subcutânea de 1ml de ar associado a 0,3 mL dos diferentes óleos vegetais: OOS, OOC, OMS, OMC, OSS e OSC ou 0,3 mL de MAR ou 0,3 mL de ALU para a indução da RIA (Edwards & Sedgwick, 1980). Para a avaliação da RIA, 1ml de PBS contendo 20 U de heparina foi injetado no sítio da inflamação. A Reação Infamatória Aguda foi quantificada através da análise dos exsudatos inflamatório colhidos nos intervalos de 6 e 24h.

Após a diluição do exsudato em PBS, solução de ácido acético 1% foi adicionada e as células nucleadas foram contadas em câmara de Neubauer. O precipitado foi ressuspenso em PBS contendo 100 µl de soro fetal bovino e centrifugado a citológico diferencial. A coloração das células foi feita pelo método de May-Grünwald-Giemsa e a percentagem de mononucleares e polimorfonucleares foi determinada por análise em microscópio óptico.

3.2.12- Efeito dos óleos vegetais sobre a produção de nitrito *in vivo* nos modelos de bolsa de ar subcutânea.

A produção de nitrito (NO_2^-) no sobrenadante obtido dos lavados da BAS e da CP foi medida através de método de Griess (GREEN *et al.*, 1982). Para tanto, 50 µl da amostra do sobrenadante de cada grupo foram adicionados aos poços de uma placa de microtitulação. Em seguida, igual volume do reagente de Griess (uma parte de 1% de sulfanilamida e uma parte de 0,1% de dihidrocloridrato de naftiletlenodiamino e uma parte de ácido fosfórico a 5%) foi adicionado aos mesmos poços. Após 10 minutos de incubação na ausência de luz a temperatura ambiente, foi realizada a leitura espectrofotométrica em leitor de ELISA a 492 nm. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas. Os valores de leitura foram comparados com os da curva-padrão de Nitrito de sódio (5-80 µM) e os resultados foram expressos em µM de nitrito/animal.

3.2.13- Método Estatístico

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão médio. Todos os cálculos foram realizados usando o programa STATVIEW. Os resultados foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA). As diferenças significativas entre os tratamentos com relação ao número de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos, NO (óxido nítrico) e interação da resposta imunológica, foram determinados utilizando o teste de Tukey ($p < 0,05$).

4- RESULTADOS

4.1- Caracterização bioquímica e microbiológica dos óleos de oliva, milho e soja.

Os óleos comerciais não apresentaram crescimento bacteriano e nem presença de compostos que alterassem a qualidade do óleo (Resultados não mostrados).

Na tabela 2 pode ser observado o resultado do "Droplet test" dos óleos vegetais e pode ser constatado que o tempo necessário para a formação da emulsão foi de 15 minutos para OOS, OOC e OMC. Já OSS, OSC e OMS levaram 25 minutos para a formação da emulsão. A gota do OOC e do OMC perdurou apenas 2 minutos intacta após o gotejamento em água destilada. A gota do OSS, que levou 25 minutos para formar a emulsão, permaneceu 3 minutos e a do OMS apenas 2min após o gotejamento em água destilada. A gota do OSC, que também levou 25 minutos para formar a emulsão o tempo que ela permaneceu intacta em água destilada foi de apenas 1min e 30 segundos.

Na tabela 3 pode ser observada a capacidade antioxidante dos óleos vegetais. Os compostos extraídos dos óleos de oliva foram capazes de retirar 68% dos radicais formados no sistema. Já o OMS retirou apenas 41% e o OMC, apenas 12% dos radicais formados no sistema. O OSS mostrou também uma capacidade antioxidante elevada, ca. 66%. Já o óleo de soja comestível retirou apenas 2% dos radicais formados no sistema.

As Figuras 8, 9, 10, 11 e 12, mostram os cromatogramas dos compostos não fenólicos (espectrofotometricamente medidos a 278 nm) e dos compostos fenólicos (espectrofotometricamente medidos a 325nm) isolados dos extratos metanólicos dos óleos vegetais. O extrato do óleo de oliva apresentou vários compostos não fenólicos e em 325 nm mostrou alguns compostos fenólicos. Já o OSS que também apresentou vários picos com tempos de retenção maiores que o do óleo de oliva em 278 nm, em 325 nm não foi revelada a presença de compostos fenólicos. O OSC também mostrou poucos picos elevados com absorbância a 278 nm, mas teve um

comportamento diferente do OSS, pois na absorvância de 325nm apresentou compostos fenólicos. O óleo de milho (comestível e Sigma) não apresentou compostos fenólicos e com relação aos compostos não fenólicos quase não houve diferença em seus respectivos cromatogramas (picos em 40,218 e 40,362 min ausentes em OMC).

Tabela 2 – Tempo de Permanência da Gota

Óleos Vegetais	Tempo
OOS	5 Min
OOC	3 min
OMS	2 min
OMC	2 min
OSS	2 mn
OSC	1 min e 30 seg

Tabela 3 – Atividade Antioxidante

Óleos Vegetais	(%) Radicais retirados
OOS	68
OOC	68
OMS	41
OMC	12
OSS	66
OSC	2

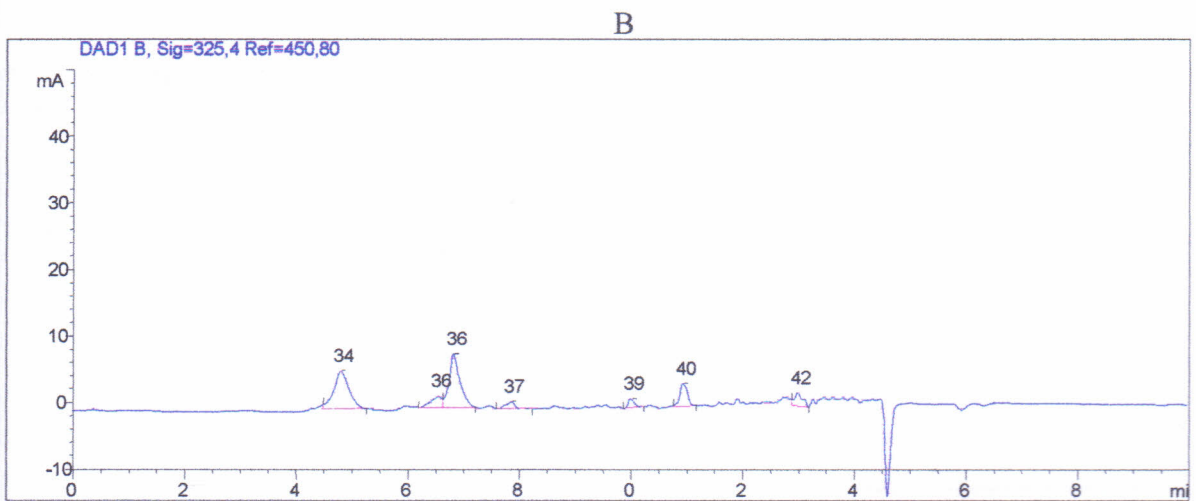
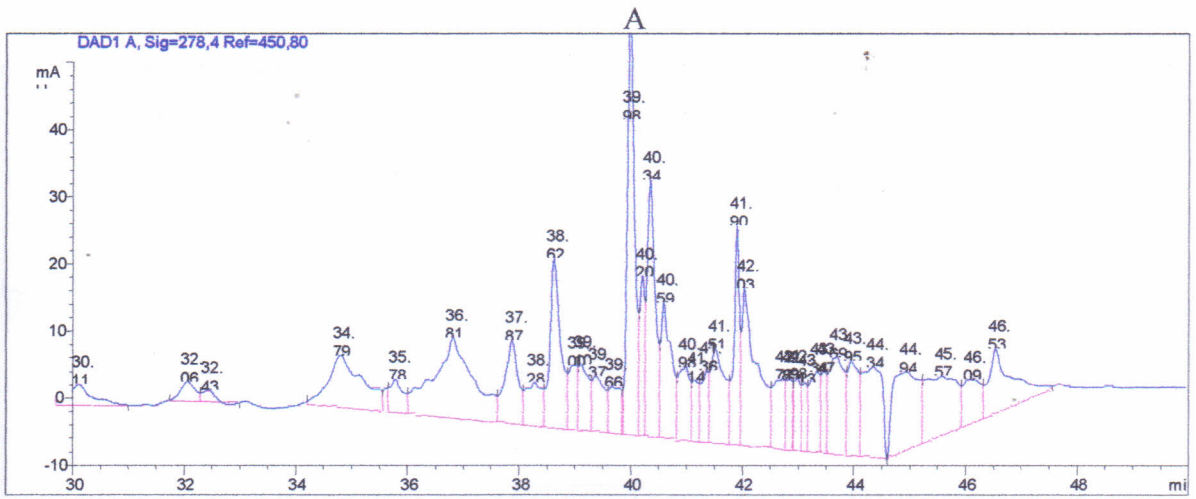


Figura 8 – Cromatogramas do Óleo de Oliva Comestível (A) Compostos não Fenólicos(278nm) e (B) Fenólicos(325nm).

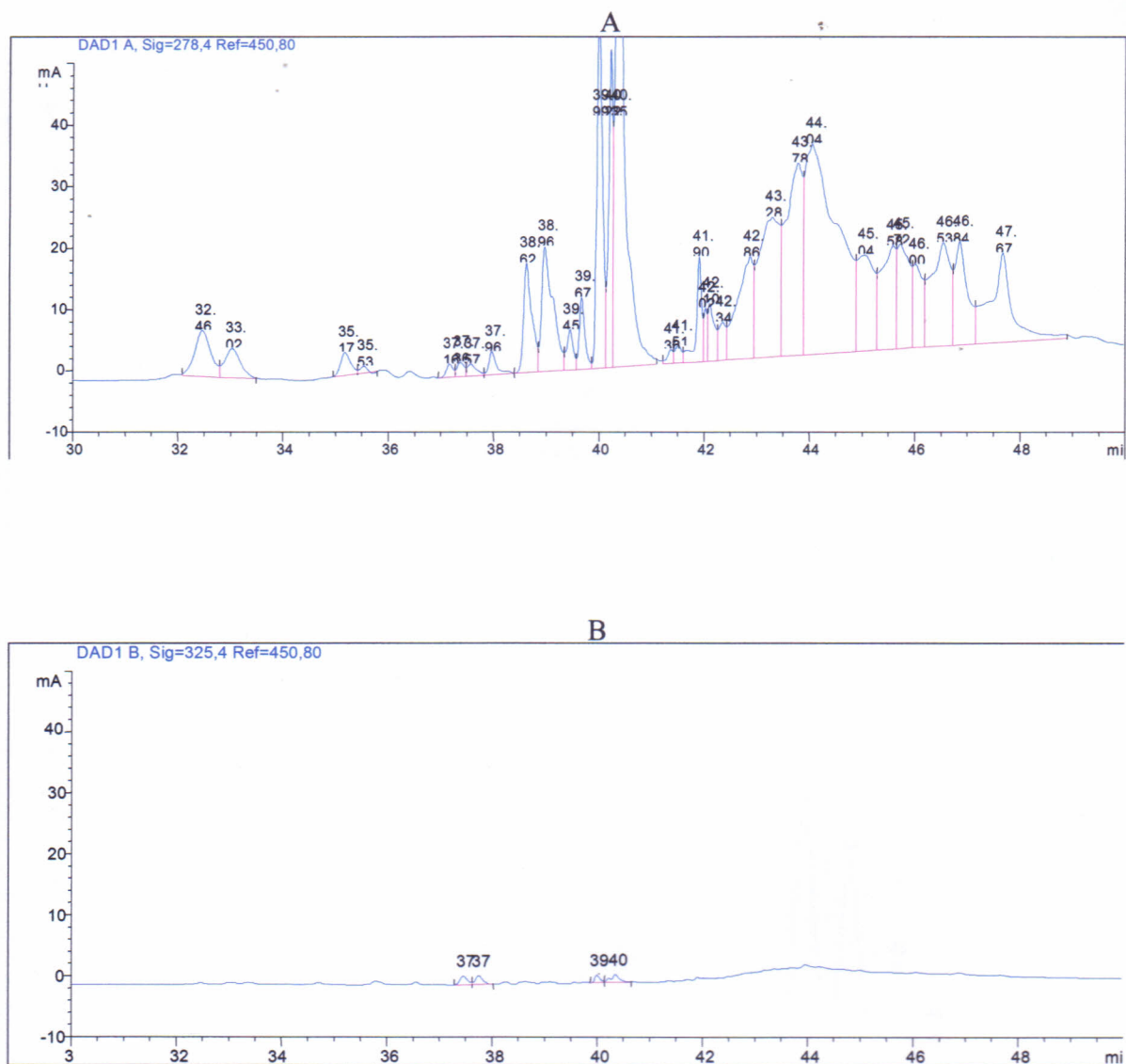


Figura 9 – Cromatogramas do Óleo de Soja de procedência Sigma (A) Compostos Não Fenólicos (270nm) e (B) Fenólicos (325nm).

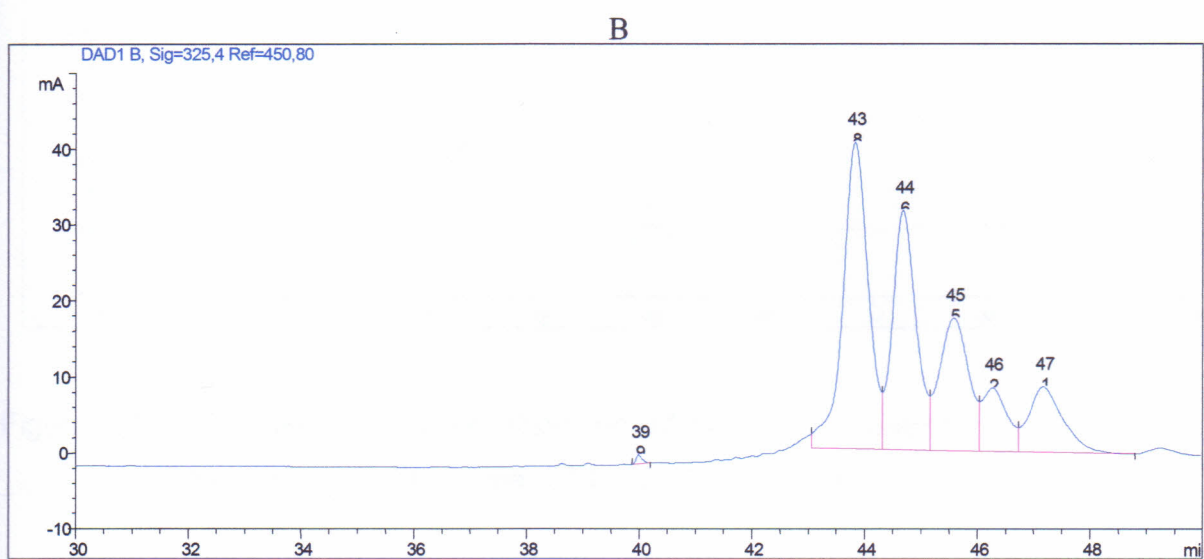
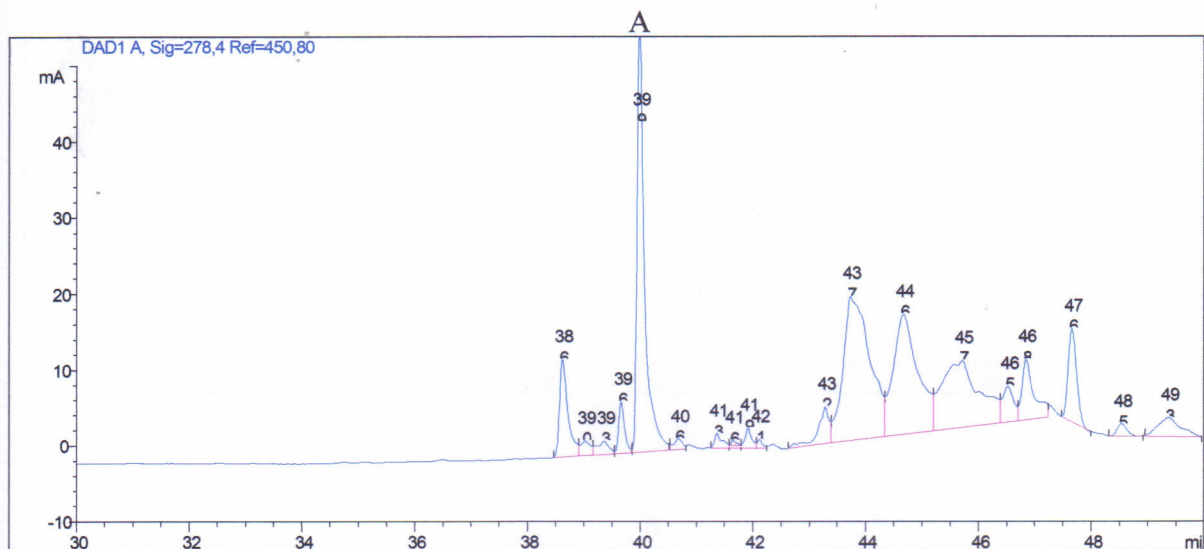


Figura 10 – Cromatogramas do Óleo de Soja Comestível (A) Compostos não Fenólicos (278nm) e (B) Fenólicos (325nm).

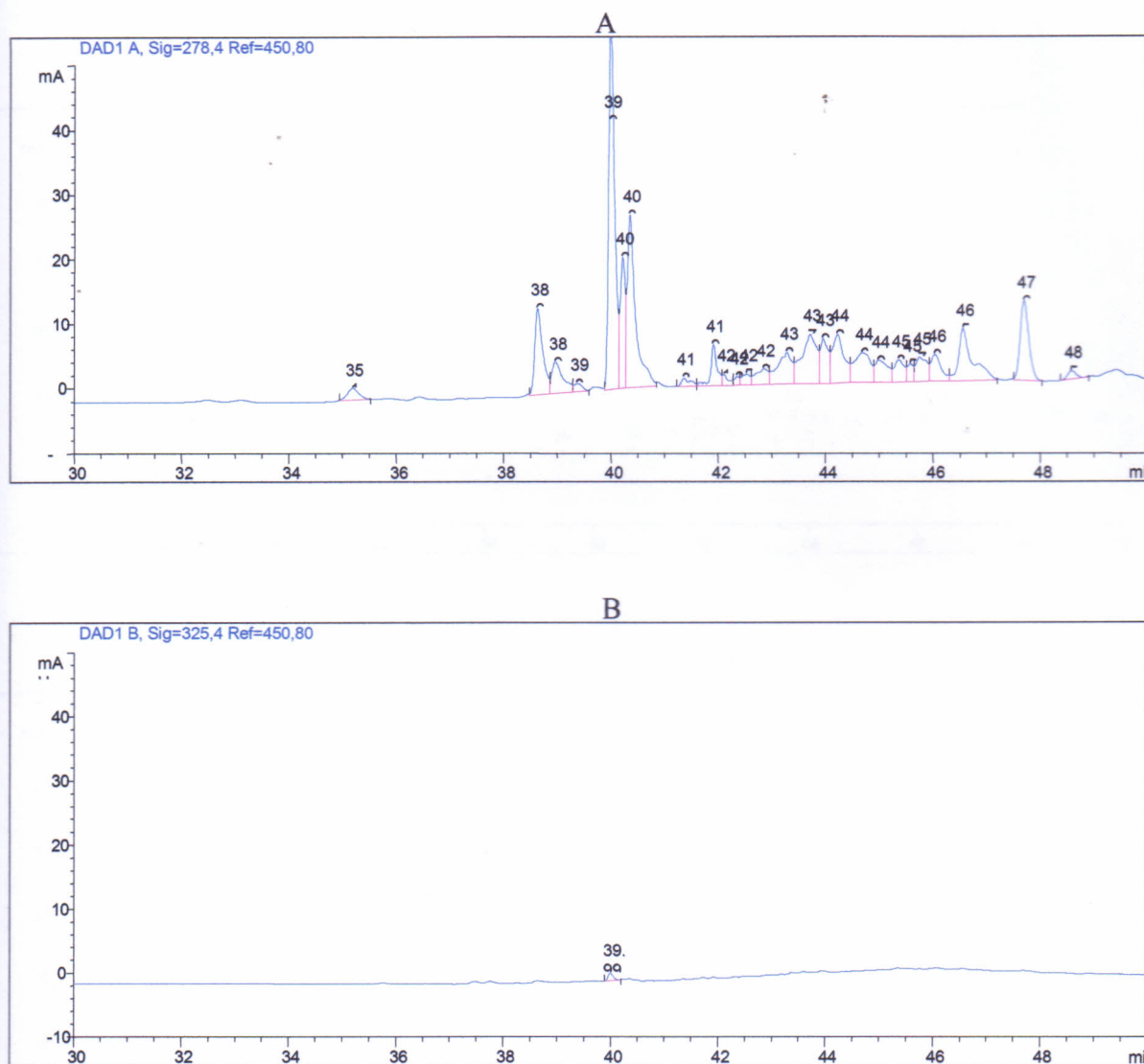


Figura 11 – Cromatogramas do Óleo de Milho de Procedência Sigma (A) Compostos não Fenólicos (278nm) e (B) Fenólicos (325nm).

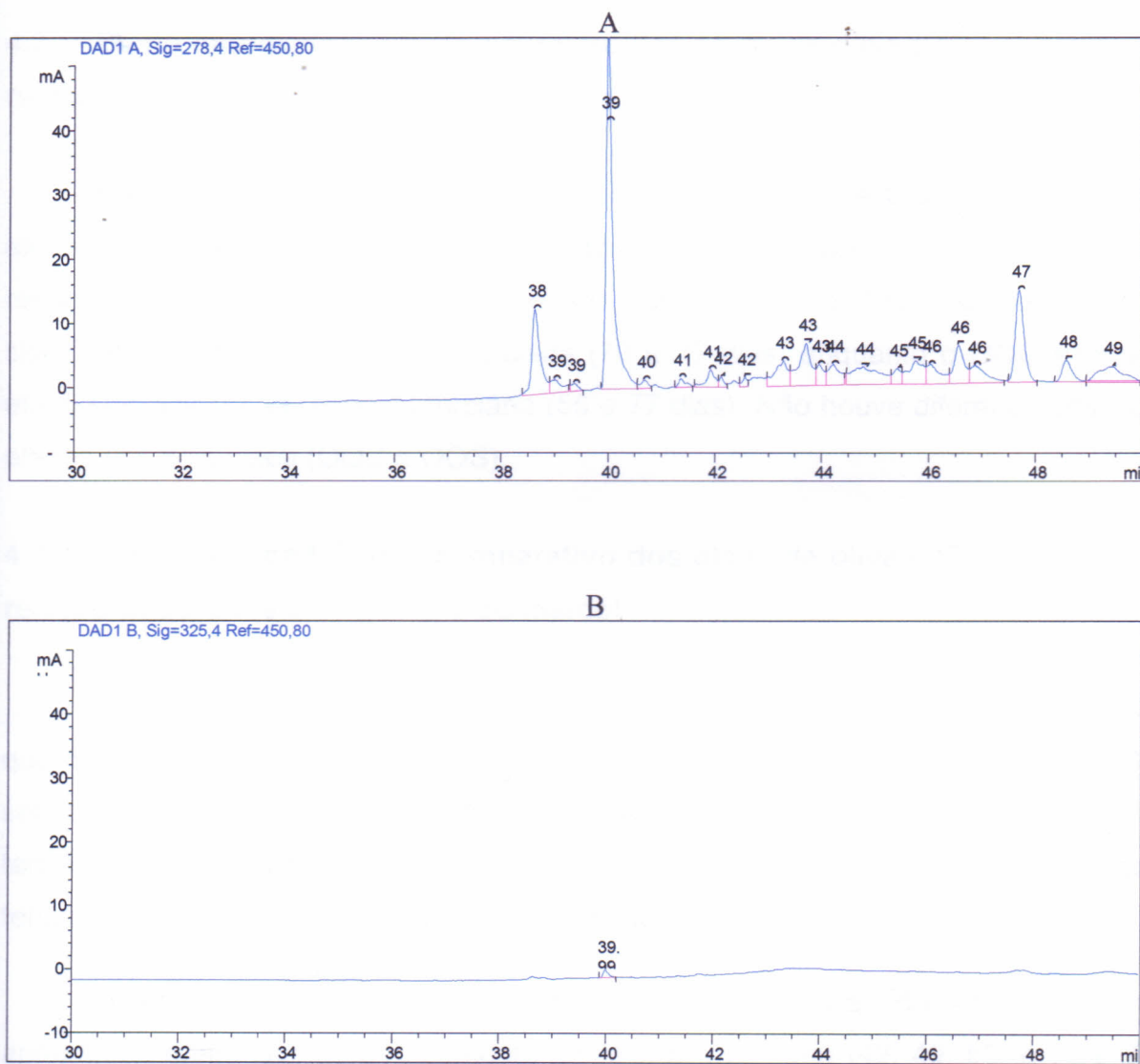


Figura 12 – Cromatogramas do Óleo de Milho Comestível (A) Compostos não Fenólicos (278nm) e (B) Fenólico (325nm)

4.2- Efeito imunoadjuvante dos óleos de oliva, soja e milho sobre a síntese de Igs específicas (G, A e M)

4.2.1- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de oliva (OOC e OOS) em relação à imunização com ovalbumina pura.

Na Figura 13 pode ser observado que os óleos (OOC e OOS) apresentaram efeito imunoadjuvante sobre a síntese de Igs específicas (avaliadas por ELISA) nas respostas primária secundária e terciária, sendo que o OOS só teve efeito significativo no final da resposta terciária (70 e 77 dias) enquanto o OOC exerceu efeito significativo na resposta terciária (56 e 77 dias). Não houve diferença entre os efeitos dos dois óleos (OOC e OOS).

4.2.2- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de oliva (OOC e OOS) em relação aos efeitos do $Al(OH)_3$ e do marcol

Na Figura 14 pode ser observado que foi detectada síntese de Igs específicas quando a OVA estava associada ao $Al(OH)_3$, marcol e aos óleos (OOC e OOS), sendo esse efeito significativo ao longo das respostas primária, secundária e terciária, com exceção do dia 35 da resposta secundária e do dia 56 da resposta terciária do OOS, que teve efeito semelhante ao do $Al(OH)_3$.

Quando comparados os efeitos do OOC e do OOS ao do marcol, o OOS apresentou efeito significativo somente na resposta terciária (42, 49, 56, e 70 e 77 dias), enquanto o OOC apresentou resultados significativos nas respostas: secundária (35 dias) e terciária (42, 56, 63, 70 e 77 dias). Não houve diferença entre os efeitos dos dois óleos (OOC e OOS).

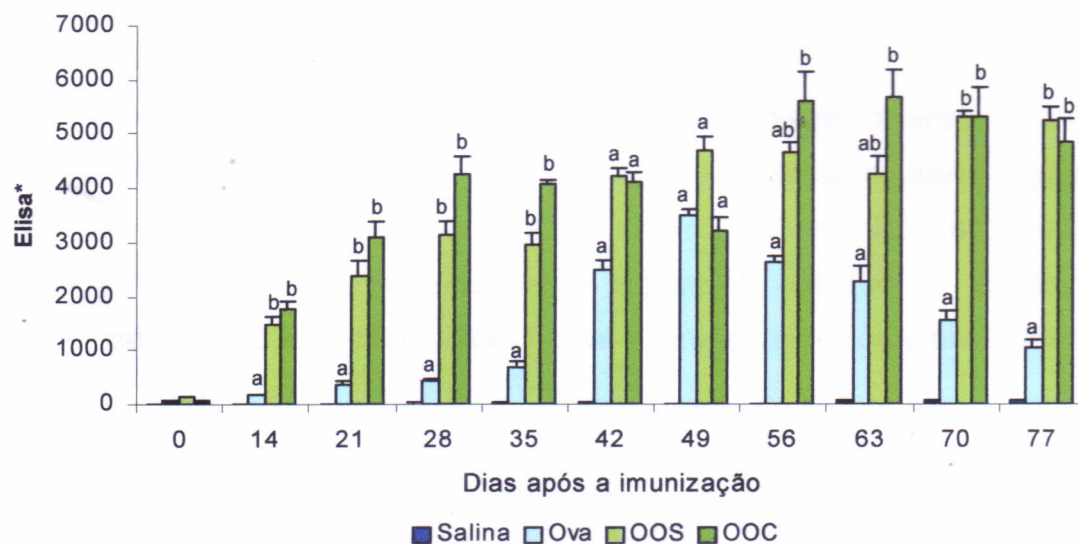


Figura 13 – Cinética das Sínteses das imunoglobulinas (G, A e M), determinadas por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada ao óleo de oliva de procedência Sigma (OOS), e ao óleo de oliva Comercial (OOC). ^{a, b} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey.

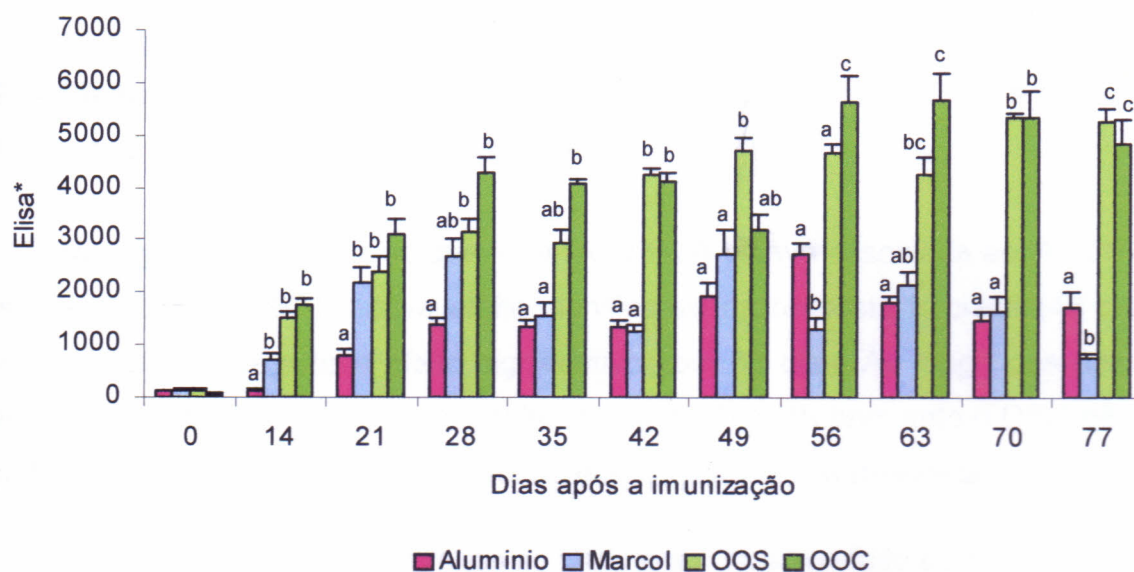


Figura 14 – Cinética das Sínteses das imunoglobulinas (G, A e M), determinadas por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura, e associada ao $Al(OH)_3$, marcol e ao óleo de oliva (OOS e OOC). ^{a, b, c, d} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey.

4.2.3- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de oliva (OOC e OOS) em relação ao efeito do adjuvante de Freund

Na Figura 15 pode ser observado que não houve diferença entre os efeitos dos dois óleos (OOC e OOS) ao longo da imunização em relação ao efeito adjuvante do CFA1 (Adjuvante completo de Freund usado nas imunizações primária, secundária e terciária) e CFA2 (Adjuvante incompleto de Freund usado nas imunizações secundária e terciária). Não houve diferença entre os efeitos dos dois óleos (OOC e OOS).

4.2.4- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de soja (OSC e OSS) em relação à imunização com ovalbumina pura

A comparação dos efeitos adjuvantes dos óleos (OSC e OSS) sobre a síntese de Igs anti-ovalbumina está indicada na Figura 16. O OSS só teve efeito significativo na resposta secundária com 35 dias e o OSC, com 28 e 35 dias. Na análise comparativa entre os efeitos dos dois óleos apenas o OSS teve efeito significativo no final da resposta terciária (63,70 e 77 dias) em relação ao OSC.

4.2.5- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de soja (OSC e OSS) em relação aos efeitos do $Al(OH)_3$ e do marcol

Na Figura 17 observa-se que, quando a OVA estava associada ao $Al(OH)_3$ e aos óleos (OSC e OSS), houve efeito significativo na resposta terciária (42 dias), porém o OSS também teve efeito significativo com 63 dias. Ao longo dos demais dias o OSS teve efeito adjuvante semelhante ao do $Al(OH)_3$ enquanto o OSC não foi significativo com 21 dias (resposta secundária) e 70 e 77 dias (resposta terciária).

Quando comparados os efeitos do OSC e do OSS ao efeito do marcol, o OSC apresentou efeito significativo somente na resposta terciária (42 dias), mas o OSS teve efeito significativo com 42 e 77 dias. Na análise comparativa entre os efeitos dos dois óleos, apenas o OSS teve efeito significativo no final da resposta terciária (63,70 e 77 dias) em relação ao OSC.

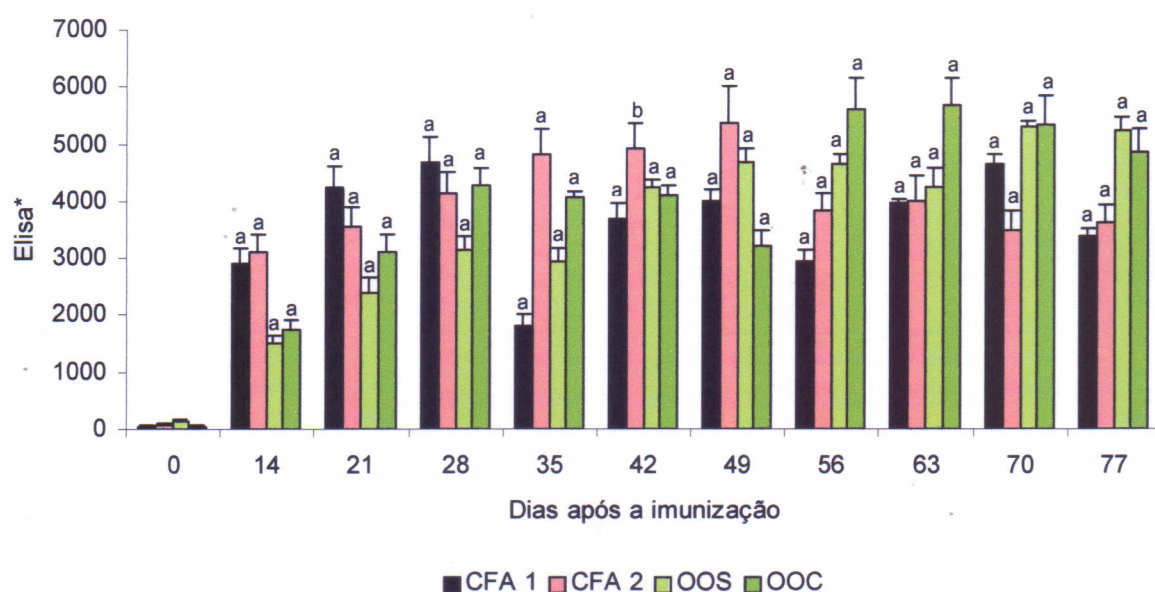


Figura 15 – Cinética das sínteses das imunoglobulinas (G, A e M), determinadas por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10 μ g de ovalbumina pura e associada a CFA1 e CFA2, OOS e OOC. ^{a, b} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey.

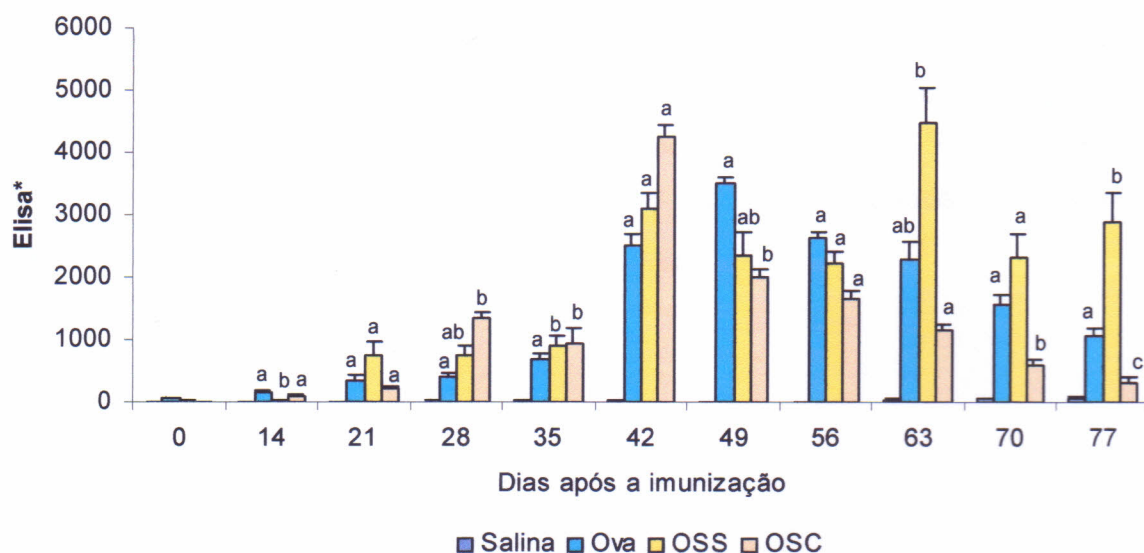


Figura 16 – Cinética das sínteses das imunoglobulinas (G, A e M), determinadas por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10 μ g de ovalbumina pura, e associada ao óleo de soja de procedência Sigma (OOS) e ao óleo de soja comercial (OSC). ^{a, b, c} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey.

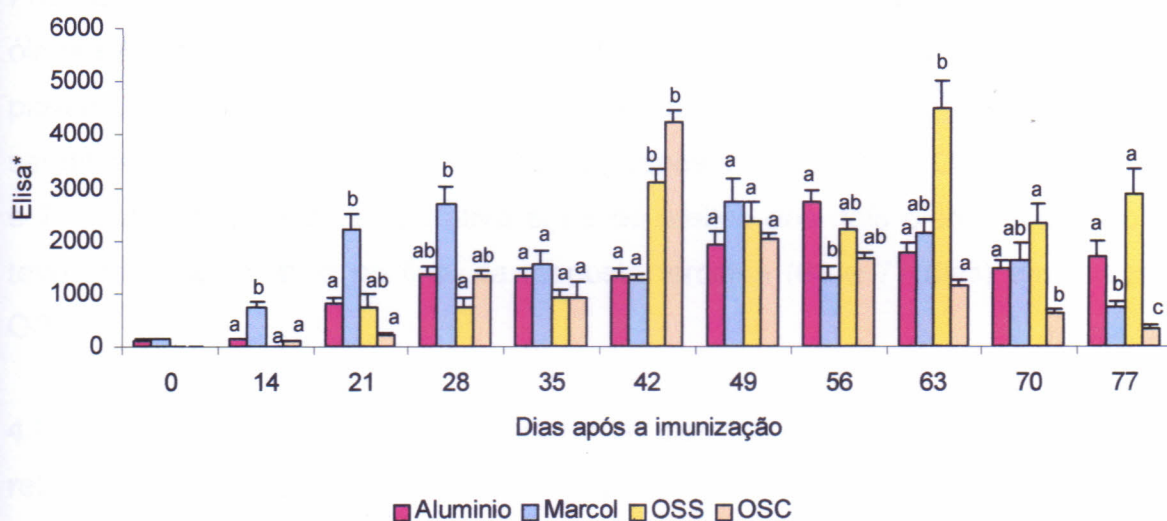


Figura 17 – Cinética das sínteses das imunoglobulinas (G, A e M), determinadas por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada ao $Al(OH)_3$, marcol, OSS e OSC. ^{a, b, c} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey.

4.2.6- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de soja (OSC e OSS) em relação ao efeito do adjuvante de Freund

Na Figura 18 não foi observado efeito significativo com os óleos nas respostas primária, secundária e terciária nem em relação ao efeito adjuvante do CFA1 (Adjuvante completo de Freund usado nas imunizações primária, secundária e terciária) nem em relação ao efeito adjuvante do CFA2 (Adjuvante incompleto de Freund usado nas imunizações primária, secundária e terciária). Entretanto, estes óleos exerceram efeito semelhante ao CFA1 na resposta terciária (42, 56 e 70 dias para o OSC e 42, 56, e 77 para o OSS). Já em relação ao CFA2, OSC só teve efeito semelhante ao do adjuvante com 42 dias (resposta terciária) e o OSS com 42, 56, 70 e 77 dias. Na análise comparativa entre os efeitos dos dois óleos, apenas o OSS teve efeito significativo no final da resposta terciária (63 e 77 dias) em relação ao OSC.

4.2.7- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de milho (OMC e OMS) em relação à imunização com ovalbumina pura

Na Figura 19 pode ser observado que os óleos (OMC e OMS) tiveram efeito imunoadjuvante sobre a síntese de Igs específicas nas respostas primária e secundária, sendo que o OMS teve efeito significativo no final da resposta terciária (63, 70 e 77 dias). Na comparação entre o efeito dos óleos, o OMS teve efeito significativo nas respostas primária (21 dias) e terciária (63 e 77 dias), em relação ao OMC.

4.2.8- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de milho (OMC e OMS) em relação aos efeitos do $Al(OH)_3$ e do marcol

Na Figura 20 verifica-se que os óleos (OMC e OMS) tiveram efeito significativo nas respostas primária, secundária e terciária quando a OVA estava associada ao $Al(OH)_3$, sendo que na resposta secundária o efeito dos óleos foi

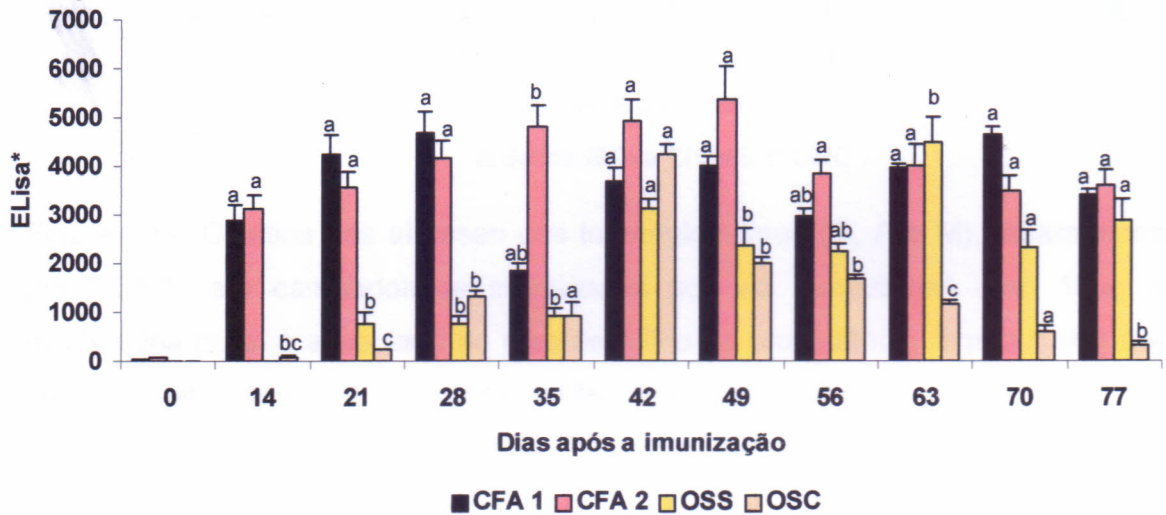


Figura 18 – Cinética das sínteses das imunoglobulinas (G, A e M), determinadas por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada a CFA1 e CFA2, OSS e OSC óleo de soja. ^{a, b, c} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey.

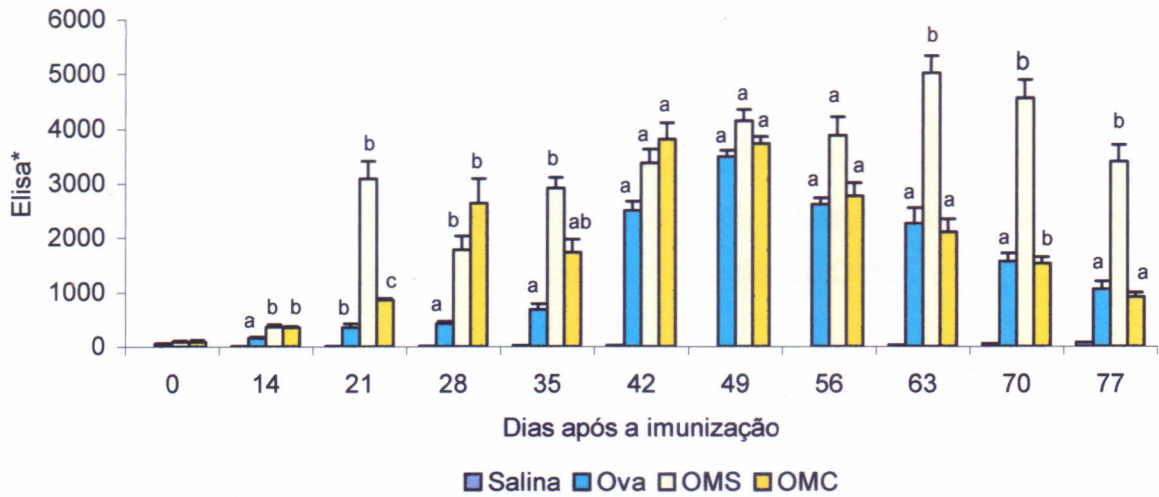


Figura 19 – Cinética das sínteses das imunoglobulinas (G, A e M), determinadas por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura, e associada ao óleo de milho de procedência Sigma (OMS) e ao óleo de milho comercial. ^{a, b} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey.

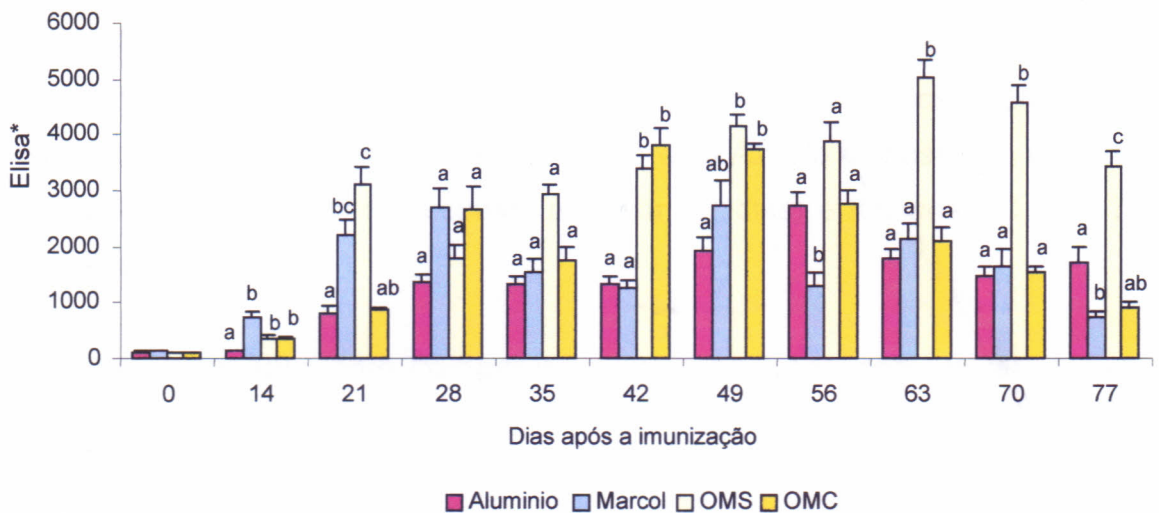


Figura 20 – Cinética das sínteses das imunoglobulinas (G, A e M), determinadas por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura, e associada ao $Al(OH)_3$, marcol, OMS e OMC. ^{a, b, c} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey.

significativo apenas com 21 dias enquanto que na resposta terciária, o OMS foi significativo com 42, 49, 63, 70 e 77 dias e o OMC somente com 42 e 49 dias.

Quando comparado ao marcol, o efeito dos óleos (OMC e OMS) só foi significativo na resposta terciária aos 42 dias para o OMC e nos dias 42, 63, 70 e 77 para o OMS. Na comparação entre os óleos o OMS foi significativo na resposta primária (21 dias) e terciária (63,70 e 77 dias) em relação ao OMC.

4.2.9- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de milho (OMC e OMS) em relação ao efeito do adjuvante de Freund

Na Figura 21 não foi observado efeito significativo com os óleos (OMC e OMS) nas respostas primária, secundária e terciária nem em relação ao efeito adjuvante do CFA1 (Adjuvante completo de Freund usado nas imunizações primária, secundária e terciária) nem em relação ao efeito adjuvante do CFA2 (Adjuvante incompleto de Freund usado nas imunizações primária, secundária e terciária). Entretanto, os óleos mostraram efeito semelhante nas respostas secundária e terciária. O OMC teve efeito adjuvante semelhante na resposta secundária (28 e 35 dias) quando comparado aos adjuvantes de Freund e o OMS teve efeito adjuvante semelhante na resposta secundária (21 e 35 dias). Durante a resposta terciária, o OMS não mostrou diferença em relação ao CFA1 e CFA2. Na comparação entre os óleos o OMS foi significativo na resposta primária (21 dias) e terciária (63,70 e 77 dias) em relação ao OMC.

4.2.10- Efeito imunoadjuvante comparativo entre os óleos comestíveis (oliva, milho e soja)

Na análise comparativa entre os óleos pode-se constatar que o óleo de oliva revelou uma capacidade adjuvante superior ao dos óleos de soja e milho nas respostas: primária (14 dias), secundária (21) e terciária (70 e 77 dias). (Figura 22).

4.2.11- Efeito imunoadjuvante comparativo entre os óleos de oliva, soja e milho com procedência controlada (Sigma)

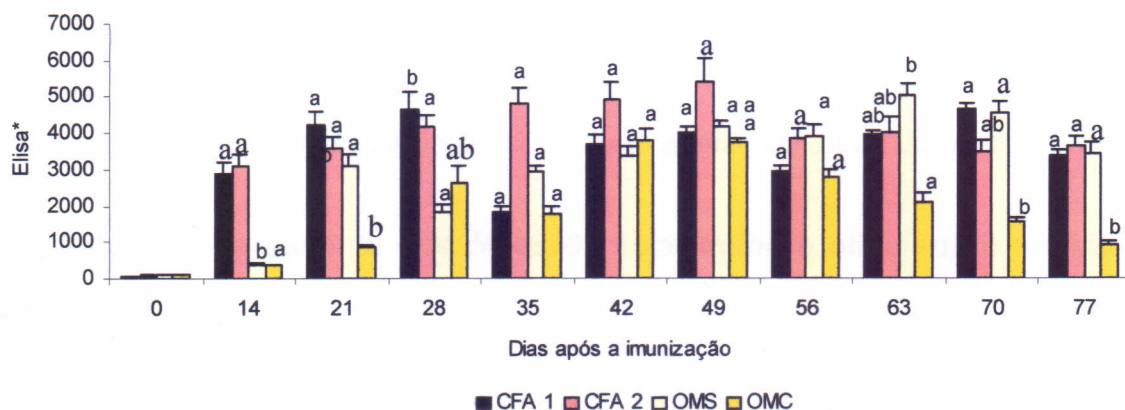


Figura 21 – Cinética das sínteses das imunoglobulinas (G, A e M), determinadas por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada a CFA1, CFA2, OMS e OMC. ^{a, b} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey.

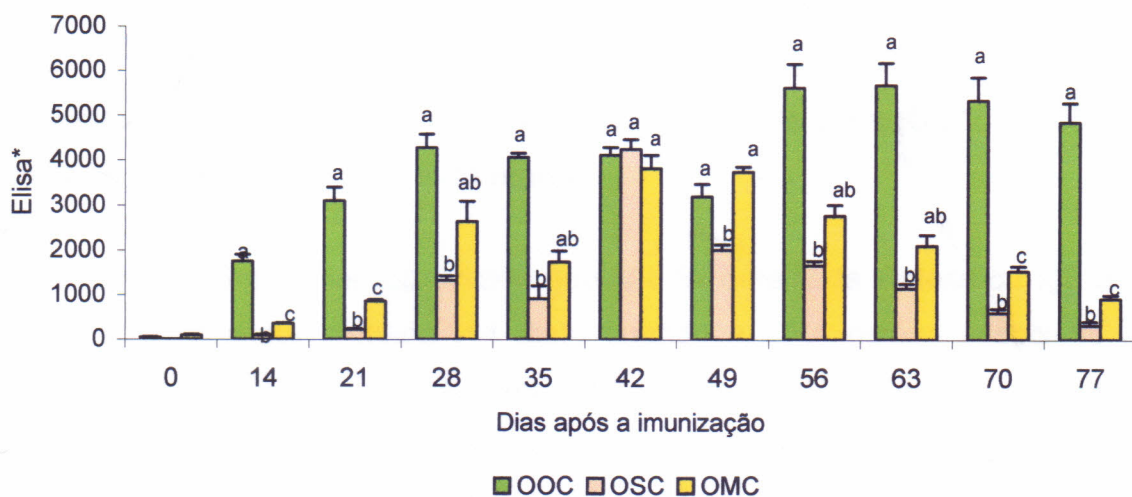


Figura 22 – Cinética das sínteses das imunoglobulinas (G, A e M), determinadas por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada aos óleos comestíveis de oliva, soja e milho. ^{a, b, c} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey.

Na Figura 23 observa-se, na comparação entre os efeitos adjuvante dos óleos de oliva, de milho e soja (*pro analyse*) que o efeito adjuvante do óleo de oliva também foi superior ao dos óleos de soja e milho (respostas primária-14 dias e secundária, 28 dias) em relação ao óleo de soja e milho. Contudo, o efeito adjuvante do óleo de milho pode ser considerado como logo abaixo do efeito do óleo de oliva.

4.3- Efeito imunoadjuvante dos óleos de soja, milho e oliva sobre a síntese de IgE específica

4.3.1- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de oliva (OOC e OOS) em relação à imunização com ovalbumina pura

Na Figura 24 pode ser observado que não foi detectada síntese de IgE anti-ovalbumina na resposta primária (14 dias) mas os óleos, OOC e OOS, tiveram efeito imunoadjuvante sobre a síntese de IgE específica (avaliadas por PCA em rato) nas respostas secundária e terciária. Na resposta terciária, aos 49 dias, apenas o OOS teve efeito adjuvante significativo quando comparado com a OVA pura. Após 49 dias não houve diferença no efeito adjuvante induzido por OOC e OOS. Não houve diferença entre os efeitos dos dois óleos (OOC e OOS).

4.3.2- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de oliva (OOC e OOS) em relação aos efeitos do Al(OH)₃ e do marcol

Na Figura 25 pode ser observado que não foi detectada síntese de IgE anti-ovalbumina na resposta primária (14 dias) quando a OVA estava associada ao marcol e aos óleos, OOC e OOS. A comparação do efeito adjuvante do OOC com o do Al(OH)₃ mostrou que o OOC teve efeito significativo comparável ao efeito do Al(OH)₃ sobre a síntese de IgE apenas após o segundo reforço. Ao longo dos demais dias, OOC teve efeito inferior ao do Al(OH)₃. O OOS também não induziu síntese de IgE anti-ovalbumina na resposta primária (14 dias) bem como não revelou efeito significativo na resposta secundária e até os 49 dias da resposta terciária.

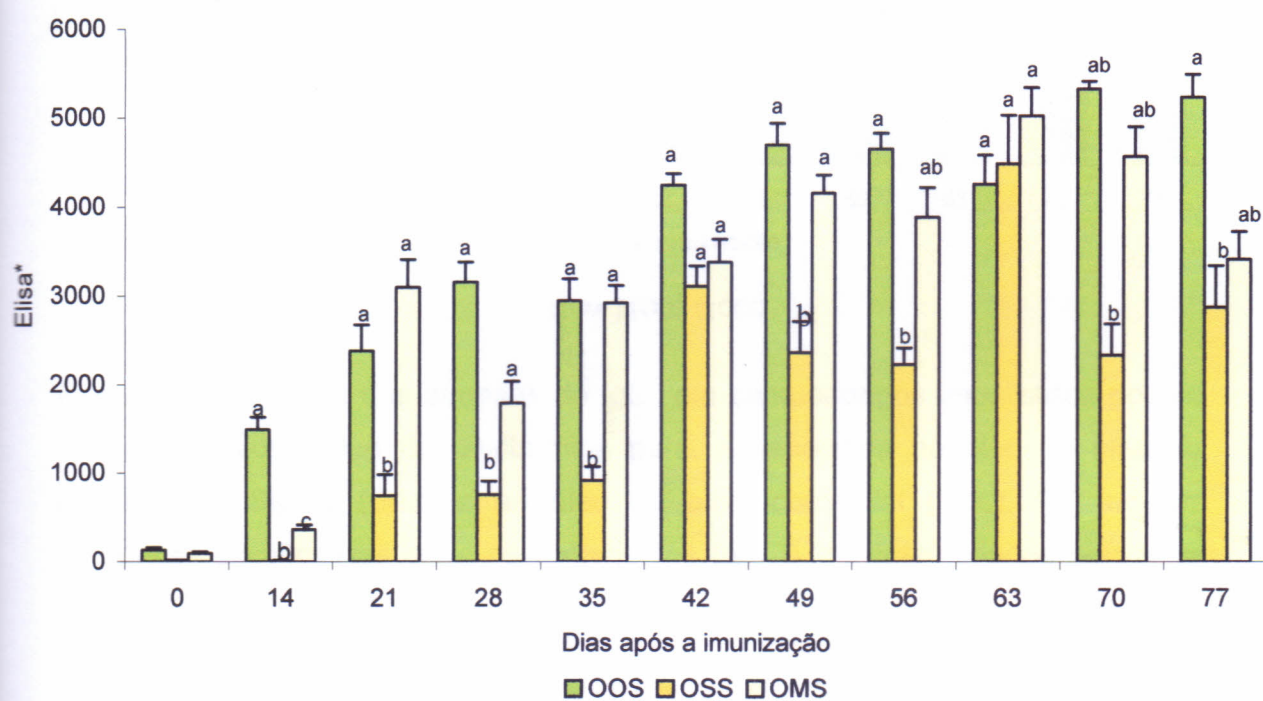


Figura 23 – Cinética das sínteses das imunoglobulinas (G, A e M), determinadas por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina associada aos óleos de procedência Sigma de oliva, soja e milho. ^{a, b, c} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey.

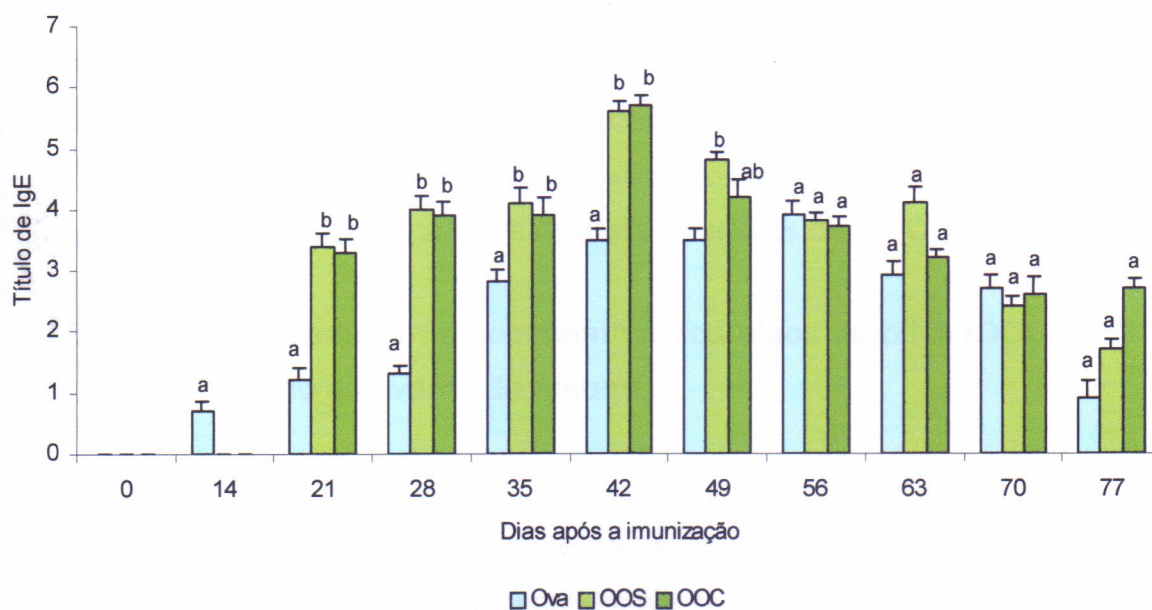


Figura 24 – Cinética das sínteses de IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura, e associada ao óleo de oliva de procedência Sigma (OOS) e ao óleo de oliva comercial (OOC). ^{a, b} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey.

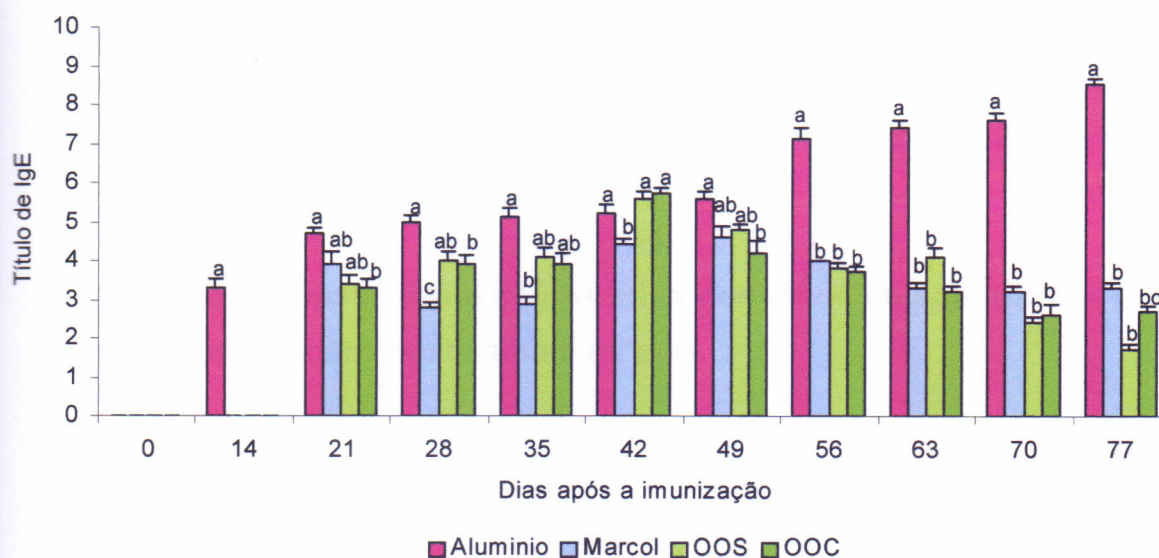


Figura 25 – Cinética das sínteses de IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura, e associada ao Al(OH)₃, marcol, OOS e OOC. ^{a, b, c} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey.

Quanto ao efeito do marcol, nem este adjuvante nem OOC e OOS influenciaram a síntese de IgE na resposta primária (Figura 25). O efeito adjuvante do OOS, comparado ao do marcol não foi significativo aos 49,56,63,70 e 77 dias da resposta terciária. Já o OOC, só teve efeito significativo apenas aos 42 dias da resposta terciária. Não houve diferença entre os efeitos dos dois óleos (OOO e OOS).

4.3.3- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de oliva (OOO e OOS) em relação ao efeito do adjuvante de Freund

Não foi observada resposta primária induzida pelos óleos, OOO e OOS (Figura 26). Em relação ao efeito adjuvante do CFA1 (Adjuvante completo de Freund usado nas imunizações primária, secundária e terciária). OOO e OOS tiveram efeito semelhante ao do adjuvante de Freund nas respostas secundária (28 e 35 dias) e terciária aos 42 e 49 dias. Já, aos 56, 63,70 e 77 dias da resposta terciária, OOS e OOO não tiveram efeito adjuvante significativo. Em relação ao efeito do adjuvante completo de Freund usado na imunização inicial e os reforços dados para as respostas secundária e terciária, feitos com adjuvante incompleto de Freund o OOS teve efeito significativo apenas aos 77 dias na resposta terciária enquanto OOO exerceu efeito significativo nos dias 42, 70 e 77 da resposta terciária. Na resposta terciária, o OOO nos dias 49, 56 e 63 e o OOS nos dias 42,49 e 70 exerceram efeito semelhante ao do CFA2. Ainda na Fig 26 observa-se que não houve diferença entre os efeitos dos dois óleos (OOO e OOS).

4.3.4- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de soja (OSC e OSS) em relação à imunização com ovalbumina pura

Na Figura 27 pode ser observado que não foi detectada síntese de IgE anti-ovalbumina na resposta primária (14 dias). O OSC teve efeito adjuvante significativo sobre a síntese de IgE à exceção do dia 56 (resposta terciária) quando o efeito desse óleo foi igual ao exercido pela OVA pura. Já o OSS ele teve efeito adjuvante ao longo das respostas secundária e terciária, à exceção do dia 35 da resposta secundária quando o seu efeito foi idêntico ao da OVA pura. Quanto à análise

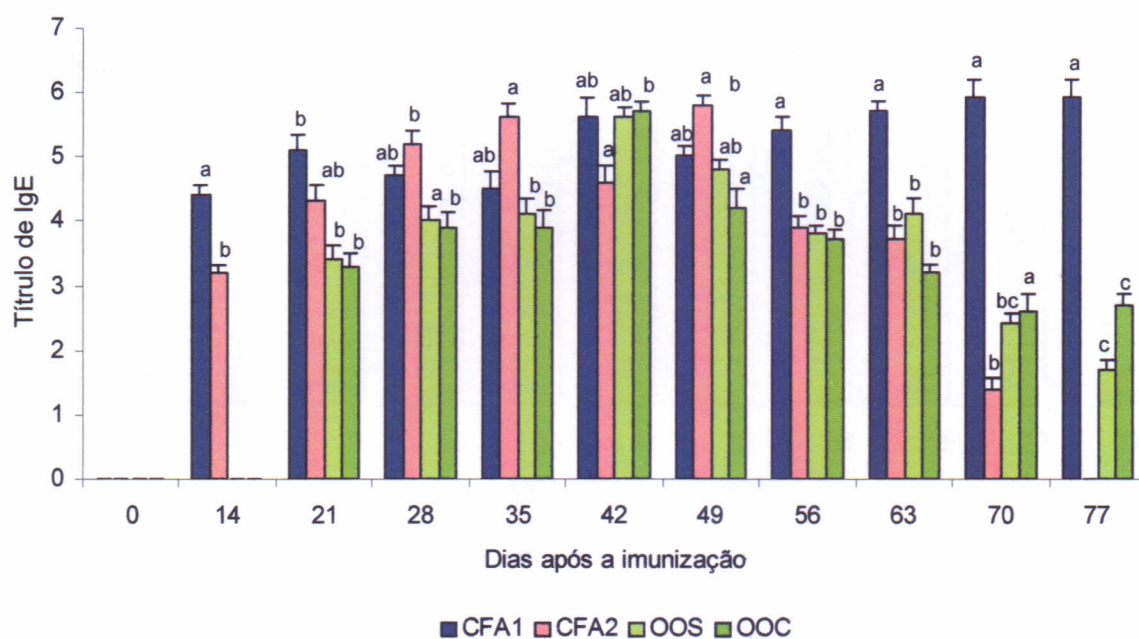


Figura 26 – Cinética das sínteses de IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura, e associada a CFA1, CFA2, OOS e OOC. ^{a, b, c} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey.

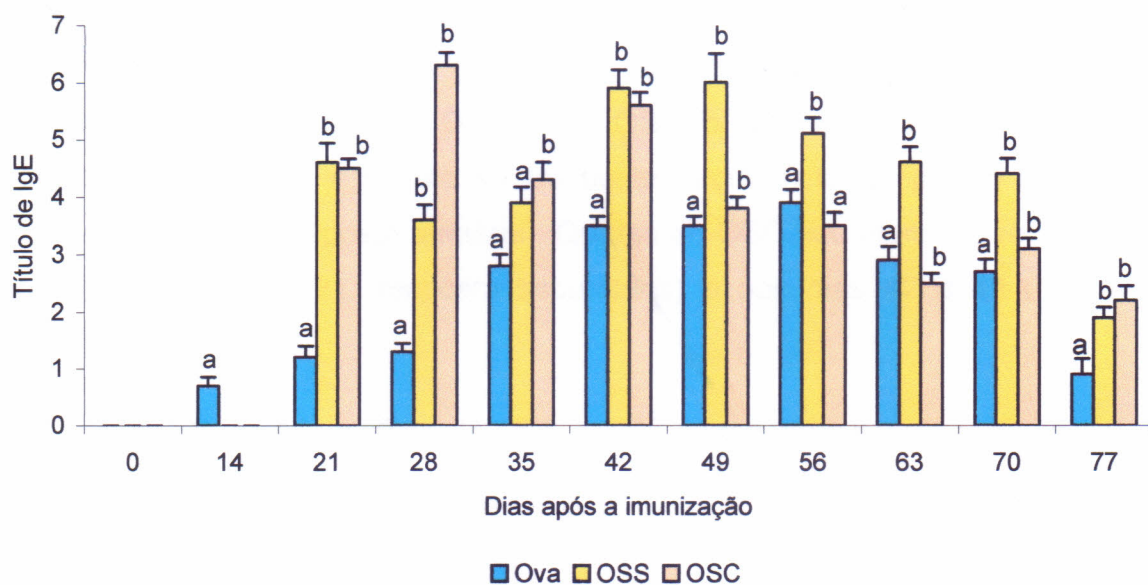


Figura 27 – Cinética das sínteses de IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura, e associada ao óleo de soja de procedência Sigma (OSS) e ao óleo de soja de procedência comercial (OSC). ^{a, b} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey.

comparativa dos efeitos dos dois óleos, o efeito do OSC foi mais elevado que o efeito do OSS no dia 35 (resposta secundária), mas, aos 56 dias (resposta terciária), o efeito do OSS foi superior ao do OSC.

4.3.5- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de soja (OSC e OSS) em relação aos efeitos do $Al(OH)_3$ e do marcol

Na Figura 28 pode ser observado que não foi detectada síntese de IgE anti-ovalbumina na resposta primária (14 dias) quando a OVA estava associada ao marcol e aos óleos, OSC e OSS. O efeito do OSS foi idêntico ao do $Al(OH)_3$ do dia 21 (resposta secundária) e no dia 49 (resposta terciária) tendo porém um efeito significativo no dia 42 (resposta terciária). Quanto ao OSC seu efeito foi semelhante ao do $Al(OH)_3$ nos dias 21 (resposta secundária) e nos dias 42 e 49 (resposta terciária).

Quando comparado o efeito de OSC e OSS com o marcol o efeito significativo dos óleos revelou-se apenas durante a resposta terciária. Observa-se também que, na resposta terciária os efeitos do OSS (49 e 77 dias) e do OSC (49,56 e 70 dias) não diferiram do efeito do marcol. Durante toda a resposta secundária não houve diferença entre os efeitos dos óleos e o efeito do marcol. Não houve diferença entre os efeitos dos dois óleos (OSC e OSS).

4.3.6- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de soja (OSC e OSS) em relação ao efeito do adjuvante de Freund

Não foi observada resposta primária induzida pelos óleos, OSC e OSS (Figura 29). Em relação ao efeito adjuvante do CFA1 (Adjuvante completo de Freund usado nas imunizações primária, secundária e terciária). Os efeitos de OSS comparado com os de CFA1 foram significativos na resposta terciária (42,56,70 e 77 dias), enquanto que, em relação ao CFA2, OSS também apresentou resultados significativos na resposta terciária (42,70 e 77 dias). Na resposta secundária (21 dias) OSS teve efeito semelhante ao CFA1 e CFA2. Já o efeito do OSC nas respostas secundária (28 e 35 dias) e terciária (49 e 63 dias) foi semelhante ao

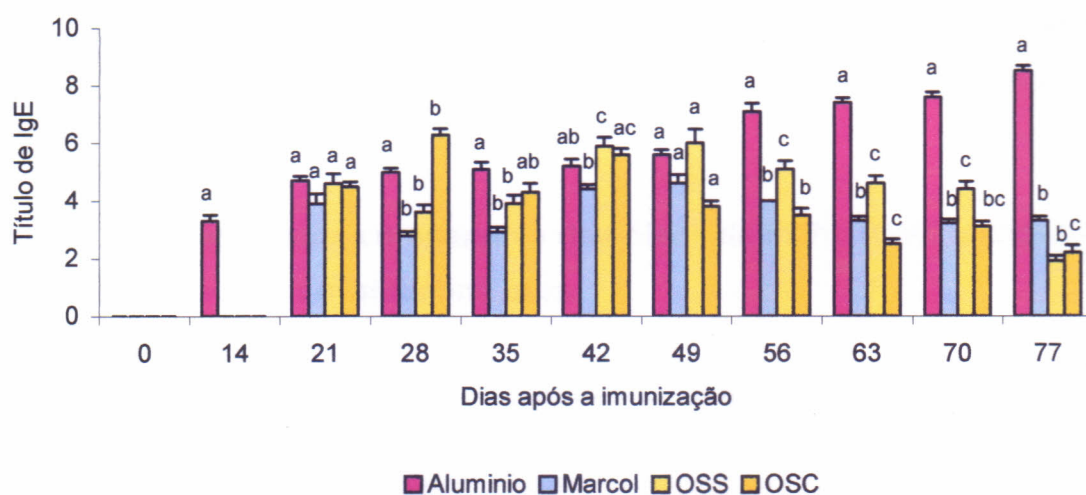


Figura 28 – Cinética das sínteses de IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada ao Al(OH)₃, marcol, OSS e OSC. a, b, c indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05) determinados pelo teste de Tukey.

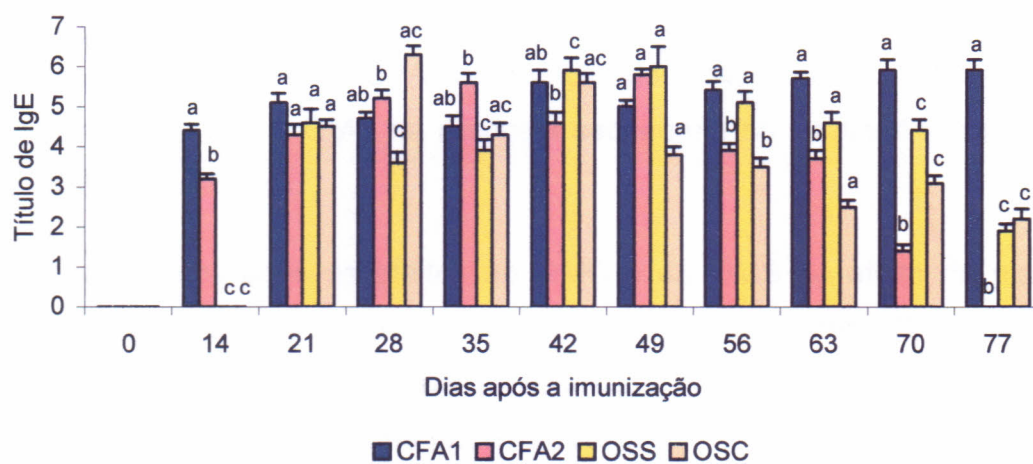


Figura 29 – Cinética das sínteses de IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada a CFA1, CFA2, OSS e OSC. a, b, c indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05) determinados pelo teste de Tukey.

CFA1. Em relação ao CFA2 o efeito significativo do OSC foi durante resposta terciária (42, 56, 70 e 77 dias). Quanto à análise comparativa dos efeitos dos dois óleos, o efeito do OSC foi mais elevado que o efeito do OSS no dia 35 (resposta secundária), mas aos 56 dias (resposta terciária), o efeito do OSS foi superior ao do OSC (Figura 29).

4.3.7- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de milho (OMC e OMS) em relação à imunização com ovalbumina pura

Na Figura 30 pode ser observado que não foi detectada síntese de IgE anti-ovalbumina na resposta primária (14 dias) mas os óleos, OMC e OMS, tiveram efeito imunoadjuvante significativo durante a resposta secundária, e durante a resposta terciária sendo que o OMS teve efeito significativo até os 70 dias e OMC teve efeito significativo apenas até os 42 dias (resposta terciária)

4.3.8- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de milho (OMC e OMS) em relação aos efeitos do Al(OH)₃ e do marcol

Na Figura 31 pode ser observado que não foi detectada síntese de IgE anti-ovalbumina na resposta primária (14 dias) quando a OVA estava associada ao marcol e aos óleos, OMC e OMS. A comparação do efeito adjuvante do OLC com o do Al(OH)₃ mostrou que o OMC na resposta secundária só foi significativo com 28 dias e o OMS, com 35 dias.

Quando comparados os efeitos do OMC e do OMS ao efeito do marcol o OMS apresentou efeito significativo somente na resposta terciária (42, 49, 63, e 70 dias), enquanto o OMC apresentou resultados significativos nas respostas: secundária (28 e 35 dias) e terciária (42 e 49 dias).

4.3.9- Efeito imunoadjuvante comparativo dos óleos de soja (OMC e OMS) em relação ao efeito do adjuvante de Freund

Não foi observada resposta primária induzida pelos óleos, OMC e OMS (Figura 32). Em relação ao efeito adjuvante do CFA1, o efeito do OMS foi semelhante na

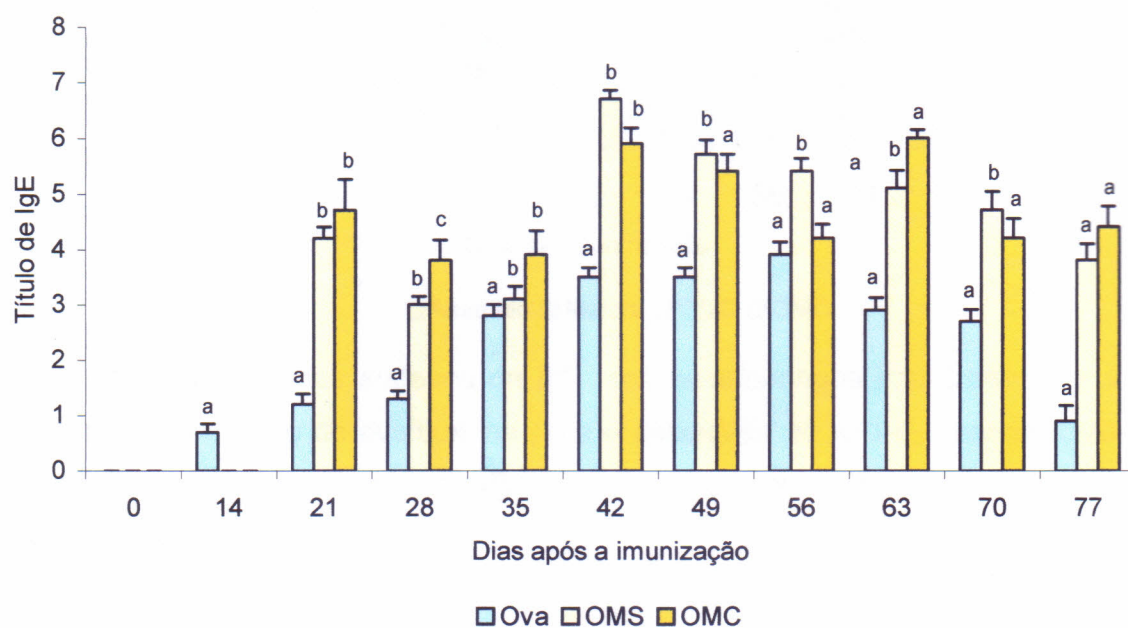


Figura 30 – Cinética das sínteses de IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada ao óleo de milho de procedência Sigma (OMS) e ao óleo de milho comercial (OMC). ^a, ^b indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey.

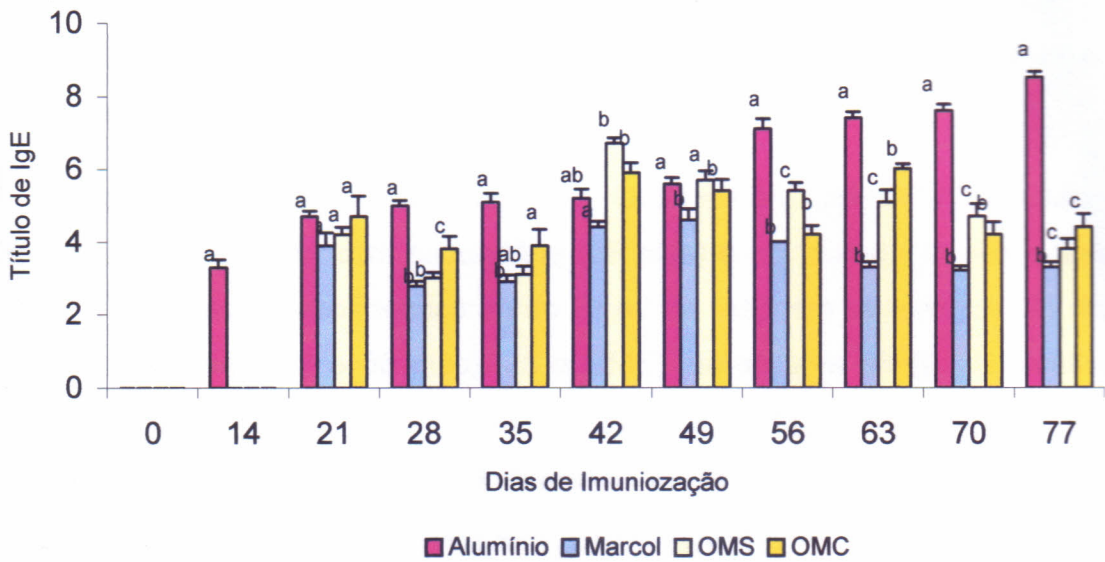


Figura 31 – Cinética das sínteses de IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada ao Al(OH)₃, marcol, OMS e OMC. a, b, c indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05) determinados pelo teste de Tukey.

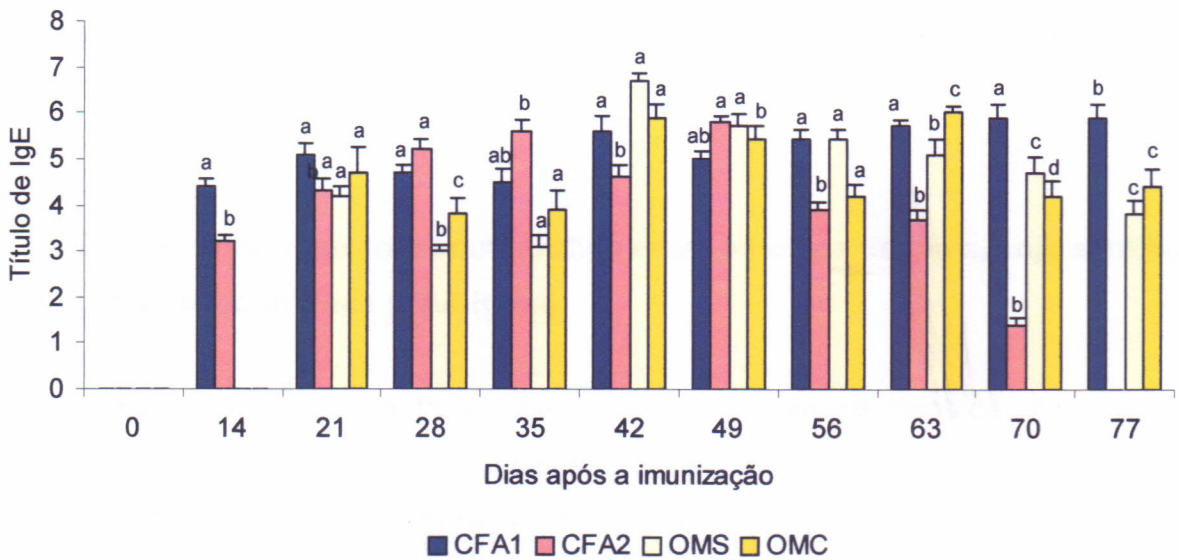


Figura 32 – Cinética das sínteses de IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura, e associada a CFA1, CFA2, OMS e OMC. a, b, c, d indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05) determinados pelo teste de Tukey.

resposta secundária (21 e 35 dias) e na resposta terciária (42, 49 e 56 dias). O OMC teve efeito significativo na resposta secundária (28 dias); teve efeito idêntico ao do CFA1 na resposta secundária (21 e 35 dias) e teve também efeito idêntico ao CFA1 na resposta terciária (42 dias).

Quanto à comparação dos efeitos de OMC e OMS com CFA2 o OMC teve efeito significativo na resposta secundária (28 dias) e no final da resposta terciária (70 e 77 dias) e teve efeito idêntico ao do CFA2 na resposta secundária (21 dias) e na resposta terciária (42 e 56 dias). Já o OMS, ele só teve efeito significativo na resposta terciária (42, 56, 70 e 77 dias), mas teve efeito idêntico ao do CFA2 na resposta secundária (21 dias) e na resposta terciária (49 e 63 dias). Quanto à análise comparativa dos efeitos dos dois óleos, o efeito do OMC foi mais elevado que o efeito do OMS no dia 35 (resposta secundária), mas aos 56 dias (resposta terciária), o efeito do OMS foi superior ao do OMC (Figura 32).

4.3.10- Efeito imunoadjuvante comparativo entre os óleos comestíveis (oliva, soja e milho)

Na Figura 33 observa-se na análise comparativa entre a capacidade imunoadjuvante dos três óleos comestíveis, apenas o óleo de soja teve efeito superior ao dos outros dois (efeito significativo na resposta terciária: 63, 70 e 77 dias).

4.3.11- Efeito imunoadjuvante comparativo entre os óleos de oliva, soja e milho de procedência controlada (PA/Sigma)

Na Figura 34 verifica-se na análise comparativa entre os óleos de oliva, soja e milho que os três óleos tiveram capacidade adjuvante semelhante, mas o óleo de soja ainda teve maior capacidade no fim da resposta terciária (77 dias).

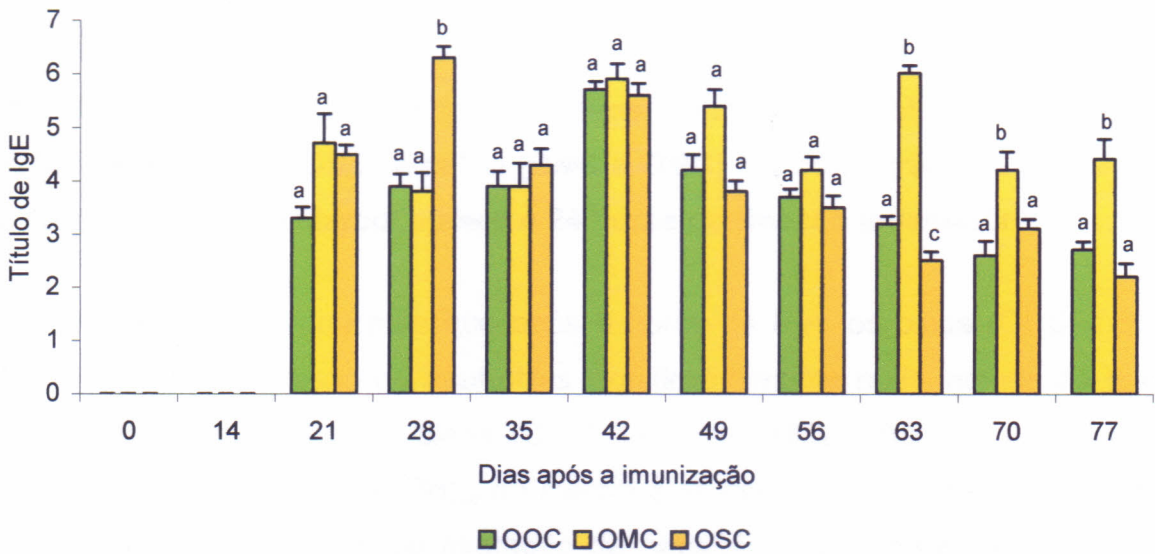


Figura 33 – Cinética das sínteses de IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina pura e associada aos óleos comestíveis de oliva, milho e soja. ^{a, b} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey.

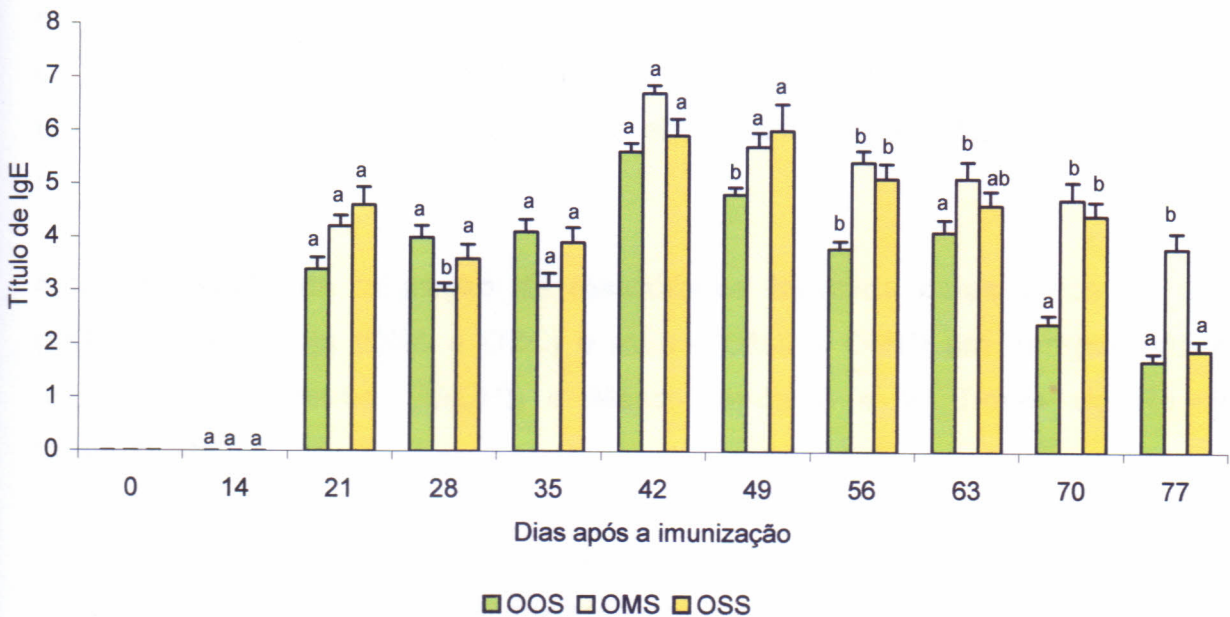


Figura 34 – Cinética das sínteses de IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina associada aos óleos de procedência Sigma de oliva, milho e soja. ^{a, b} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey.

4.4- Resposta Inflamatória induzida pelos óleos de oliva, milho e soja avaliada por migração celular

4.4.1- Avaliação da migração de neutrófilos induzida pelos óleos de oliva (OOS e OOC), soja (OSS e OSC) e milho (OMS e OMC) em comparação ao adjuvante de Freund, Al(OH)_3 e Marcol após 6 e 24 horas de Reação Inflamatória

Na Figura 35 verifica-se que após 6 horas de RIA, os óleos (OOS, OSS e OMS) induziram migração de neutrófilos significativamente mais intensa do que o Al(OH)_3 e o marcol. Já os óleos (OOC, OSC e OMC) induziram migração de neutrófilos semelhante ao Al(OH)_3 , ao marcol e ao controle. Na comparação com o CFA, somente o OOS induziu migração de neutrófilos semelhante a ele. O CFA induziu uma migração de neutrófilos significativa em relação ao controle, Al(OH)_3 e ao marcol.

Ainda na Figura 35 observa-se que, após 24 horas da resposta inflamatória, os óleos vegetais induziram migração de neutrófilos significativamente mais intensa do que o Al(OH)_3 porém idêntica a do marcol. Em comparação como o CFA, todos os óleos estimularam a migração de neutrófilos semelhante a ele. O CFA induziu uma migração de neutrófilos significativa em relação ao controle, ao Al(OH)_3 e ao marcol.

4.4.2- Avaliação da migração de macrófagos induzida pelos óleos de oliva (OOS e OOC), soja (OSS e OSC) e milho (OMS e OMC) em comparação ao adjuvante de Freund, Al(OH)_3 e Marcol após 6 e 24 horas de Reação Inflamatória

Na Figura 36 observa-se que, após 6 horas de RIA os óleos, OOS, OMS e OSS, induziram migração de macrófagos superior à do Al(OH)_3 o mesmo acontecendo em relação ao marcol e ao controle. O OOS induziu migração de macrófagos semelhante à do CFA. O CFA induziu uma migração de macrófagos significativa em relação ao controle, Al(OH)_3 e ao marcol.

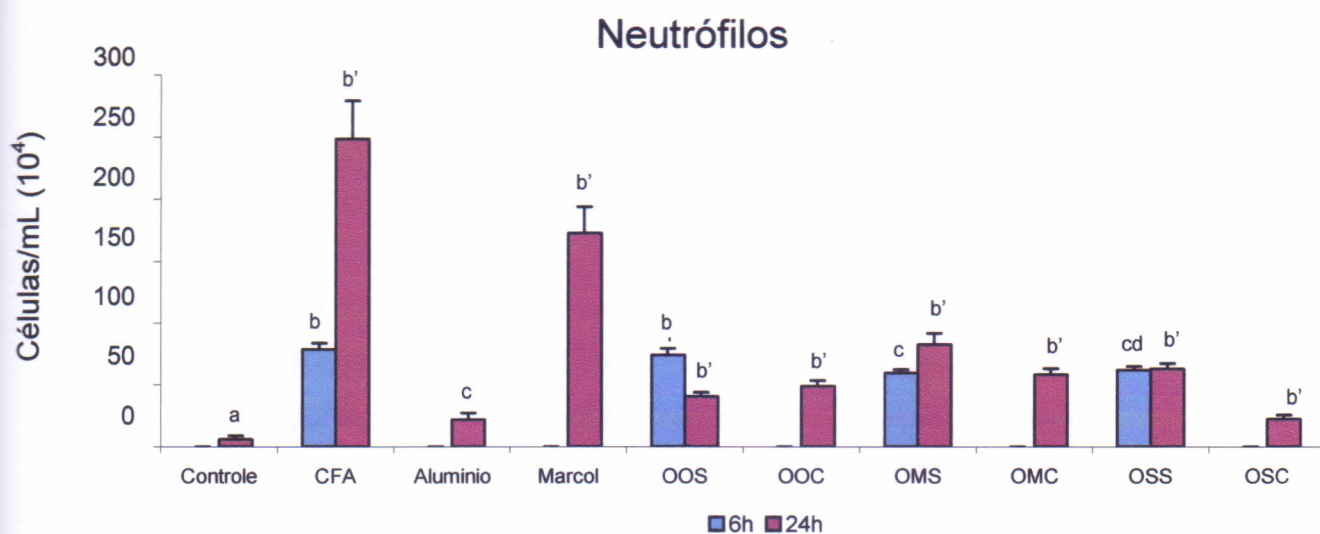


Figura 35 – Efeito dos 39leos vegetais sobre a migra393o de neutr3f3ilos em bolsa de ar subcut39nea ap39s 6 e 24 horas de rea393o inflamat39ria em camundongos Swiss. a,b,c indicam diferen39as significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey.

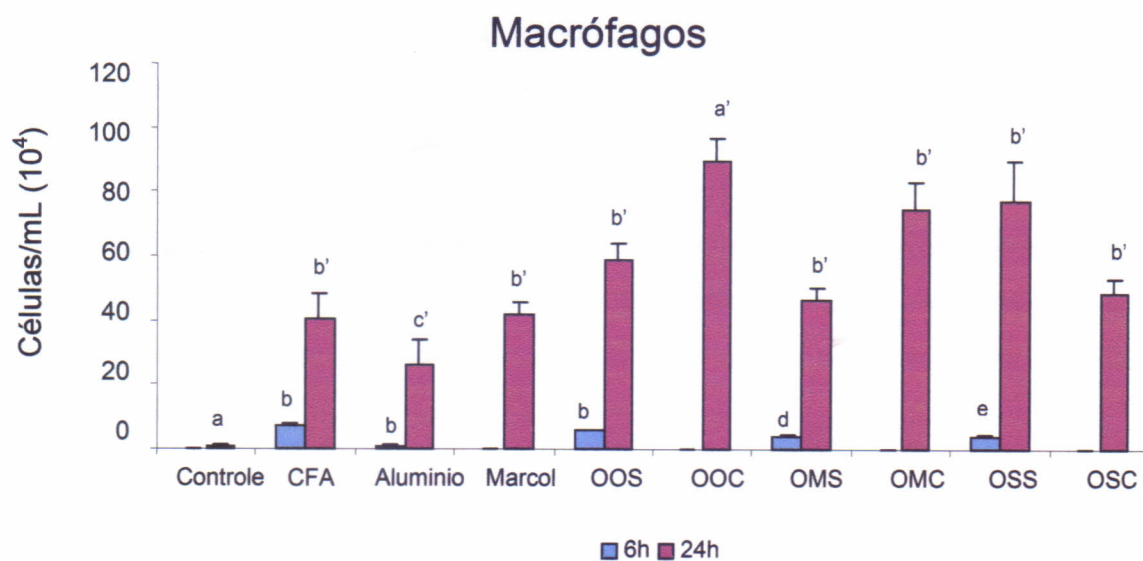


Figura 36 – Efeito dos 39leos vegetais sobre a migra393o de macr3f3ofagos em bolsa de ar subcut39nea ap39s 6 e 24 horas de rea393o inflamat39ria em camundongos Swiss. a,b,c,d,e indicam diferen39as significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey.

Ainda na Figura 36 pode-se observar que, após 24 horas da resposta inflamatória, os óleos induziram migração de macrófagos significativa em relação ao controle e ao Al(OH)_3 . Contudo, estes óleos também induziram migração de macrófagos semelhante ao marcol e ao CFA. O CFA e o marcol induziram uma migração de macrófagos significativa em relação ao controle e ao Al(OH)_3 .

4.4.3- Avaliação da migração de eosinófilos induzida pelos óleos de oliva (OOS e OOC), soja (OSS e OSC) e milho (OMS e OMC) em comparação ao adjuvante de Freund, Al(OH)_3 e Marcol após 6 e 24 horas de Reação Inflamatória

Na Figura 37 observa-se que, após 6 h de RIA, não houve efeito significativo dos óleos na migração de eosinófilos quando comparados com os adjuvantes. O CFA induziu migração de eosinófilos significativa quando comparada com o controle, com o marcol e com o Al(OH)_3 .

Ainda na Figura 37, observa-se que, após 24 horas da resposta inflamatória, os óleos induziram migração de eosinófilos significativa em relação ao controle e ao Al(OH)_3 . OOS, OSS e OMS estimularam migração de eosinófilos comparável às do marcol e do CFA. Contudo, os óleos comestíveis não induziram migração significativa de eosinófilos. O CFA e o marcol induziram migração de eosinófilos significativa quando comparada à do controle e do Al(OH)_3 .

4.4.4- Avaliação da migração de leucócitos totais induzida pelos óleos de oliva (OOS e OOC), soja (OSS e OSC) e milho (OMS e OMC) em comparação ao adjuvante de Freund, ao Al(OH)_3 e ao Marcol após 6 e 24 horas de Reação Inflamatória

Na Figura 38 observa-se que, após 6 h de RIA, não houve efeito inflamatório significativo entre os óleos (OOC, OSC e OMC) e os adjuvantes (Al(OH)_3 e Marcol) na migração de leucócitos. Entretanto, em relação ao CFA os óleos (OOS, OMS e OSS) induziram migração de leucócitos semelhante ao adjuvante de natureza mineral (CFA).

Eosinófilos

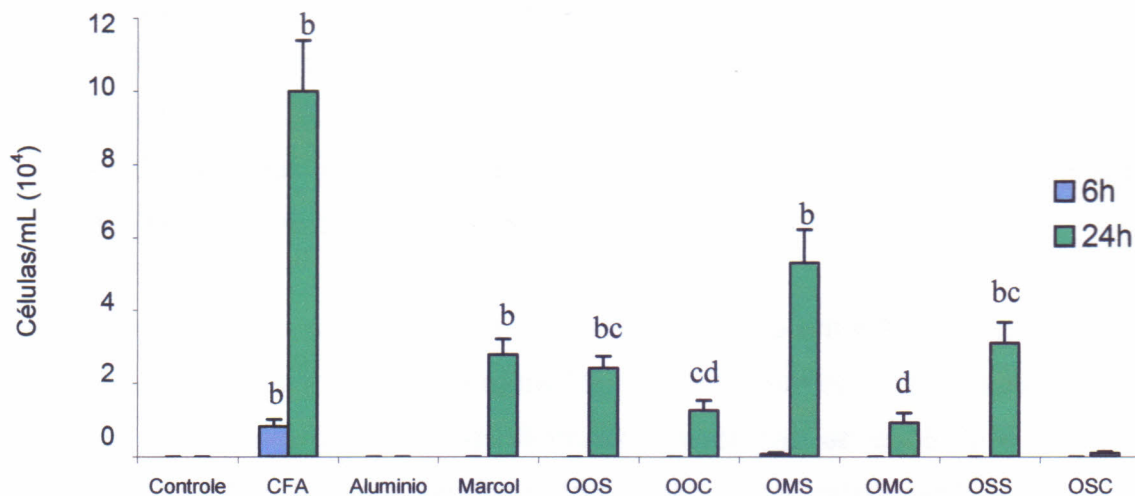


Figura 37 – Efeito dos óleos vegetais sobre a migração de eosinófilos em bolsa de ar subcutânea após 6 e 24 horas de reação inflamatória em camundongos Swiss. ^{b,c,d} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinadas pelo teste de Tukey.

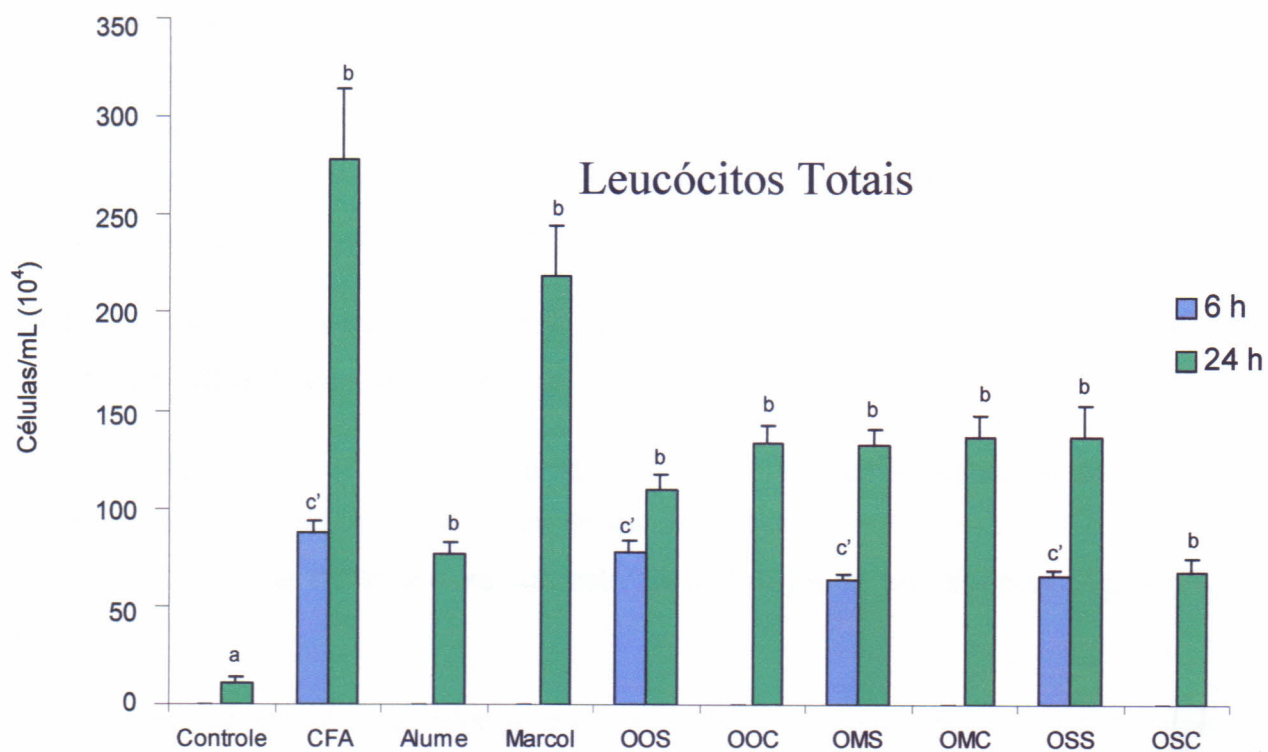


Figura 38 – Efeito dos óleos vegetais sobre a migração de leucócitos totais em bolsa de ar subcutânea após 6 e 24 horas de reação inflamatória em camundongos Swiss. ^{a,b,c} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinadas pelo teste de Tukey.

Ainda na Figura 38, observa-se que, após 24 horas da resposta inflamatória, todos os óleos induziram migração de leucócitos semelhante à dos adjuvantes.

4.4.5- Avaliação dos efeitos dos óleos de soja, milho e oliva sobre a produção de nitrito (NO^-) *in vivo* na BAS (Bolsa de Ar subcutânea)

Os efeitos dos óleos sobre a produção de nitrito em BAS nos tempos 6 e 24 horas podem ser observados na Figura 39. Os óleos aumentaram significativamente a produção de nitrito no tempo de 6 horas em relação ao controle e ao $\text{Al}(\text{OH})_3$. Entretanto, o OMS induziu produção de nitrito significativamente mais elevada quando comparada com a dos adjuvantes. OOS, OMC, OSS e OSC induziram produção de nitrito comparável a do marcol. Em relação ao CFA, os óleos (OOS, OSS e OSC) induziram maior produção de nitrito, mas OLC e OMC induziram produção de nitrito semelhante a do CFA.

Ainda na Figura 39, observa-se que os óleos, após 24 horas de reação inflamatória, induziram aumento significativo de NO^- quando comparado com o controle. Já em relação ao $\text{Al}(\text{OH})_3$, os óleos também induziram efeito significativo com exceção do OMC que teve a indução da produção de nitrito comparável à do $\text{Al}(\text{OH})_3$. Os óleos induziram produção de nitrito semelhante à do CFA e a do marcol.

4.4.6- Correlação entre os efeitos imunológicos e inflamatório dos óleos vegetais e adjuvantes clássicos

As figuras 40, 41 e 42, são uma tentativa de estabelecimento de correlação entre os efeitos imunológicos e inflamatórios dos adjuvantes $\text{Al}(\text{OH})_3$ e CFA (Fig.40) e dos óleos de soja, milho e oliva comestíveis (Fig.42) e de procedência Sigma (Fig 41).

O adjuvante clássico, alume, foi o que mostrou capacidade adjuvante mais baixa e induziu resposta inflamatória, traduzida pela migração de macrófagos mais elevada somente com 24 horas. Já o CFA (além de óleo mineral ele contém *M. tuberculosis*) ele exerceu a atividade adjuvante mais elevada bem como teve maior atividade inflamatória revelada através da migração de macrófagos mais intensa

com 24 horas. Em relação à produção de NO tanto o CFA como o alume, ambos induziram produção de NO mais elevada somente com 24 horas, embora em termos absolutos a produção induzida pelo CFA foi bastante mais elevada. O CFA revelou acúmulo de neutrófilos mais intenso nos dois tempos avaliados quando comparado com o alume (Fig. 40).

Quanto aos óleos vegetais de procedência Sigma, os óleos de milho e oliva tiveram capacidade imunoadjuvante correlacionada com a atividade inflamatória traduzida pelas migrações de neutrófilos e de macrófagos (6 e 24 h), com a produção de NO e a atividade antioxidante. Quanto ao óleo de oliva ele mostrou alta capacidade antioxidante, mas provocou uma produção de NO mais baixa. O óleo de soja que teve uma capacidade adjuvante mais baixa do que oliva e milho após 3 semanas da resposta secundária e 3 semanas da resposta terciária induziu migração de macrófagos mais elevado com 24 horas. Já a produção de NO foi mais elevada com 6 horas tendo também uma alta capacidade antioxidante. Ainda podemos observar que o milho que teve a capacidade antioxidante mais baixa permaneceu com a migração de neutrófilos mais intensa até com 24 horas. Os óleos de oliva e soja induziram capacidade antioxidante mais elevada e acúmulo de neutrófilos menos intenso do que OMS com 24 horas (Fig. 41).

Quanto aos óleos vegetais comestíveis, de modo geral eles tiveram uma resposta inflamatória menos intensa que a dos óleos de procedência Sigma, mas revelaram uma capacidade imunoadjuvante elevada. Observa-se que, OSC apresentou capacidade antioxidante mais baixa, mas induziu produção de NO mais elevada nos dois tempos avaliados. O OMC apresentou a capacidade antioxidante inferior à do OOC induzindo produção de NO mais elevado com 6 horas. O OOC mostrou maior capacidade imunoadjuvante e induziu maior acúmulo de macrófagos com 24 horas quando comparado com OMC e OSC. Já em relação aos neutrófilos os dois óleos (OOC e OMC) que mostraram maior capacidade imunoadjuvante induziram também um acúmulo de neutrófilo mais intenso que o óleo de soja (Fig.42).

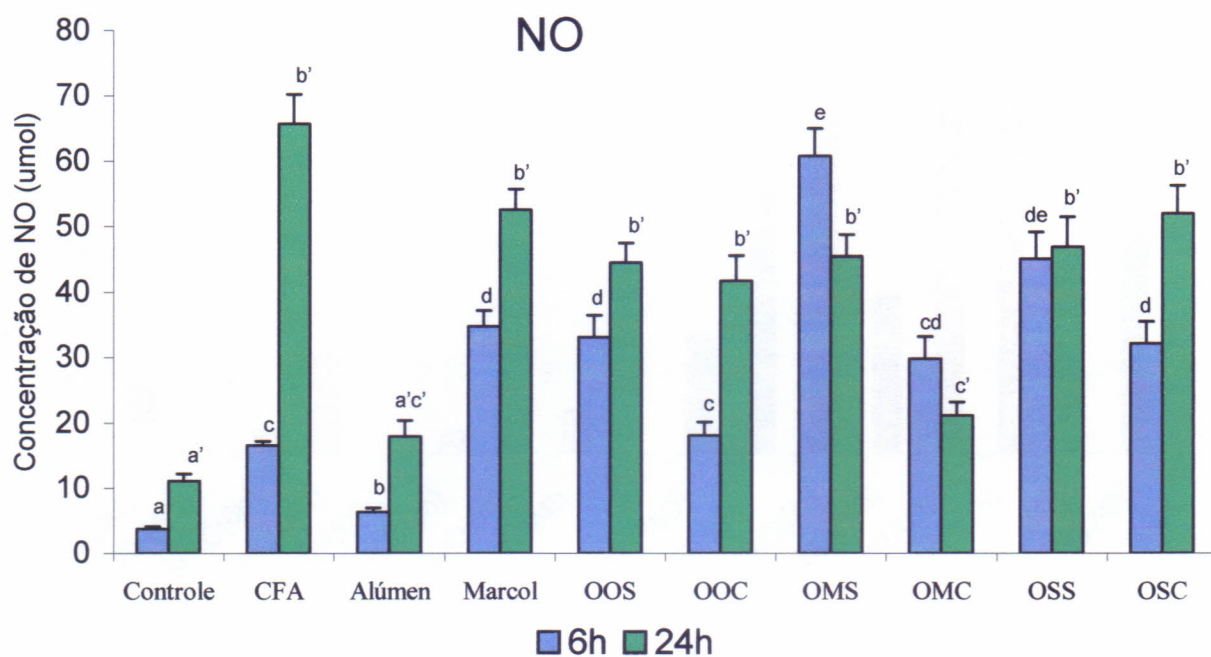


Figura 39 – Produção de NO em bolsa de ar subcutânea induzida por óleos vegetais após 6 e 24 horas de reação inflamatória em camundongos Swiss. ^{a,b,c,d,e} indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) determinados pelo teste de Tukey.

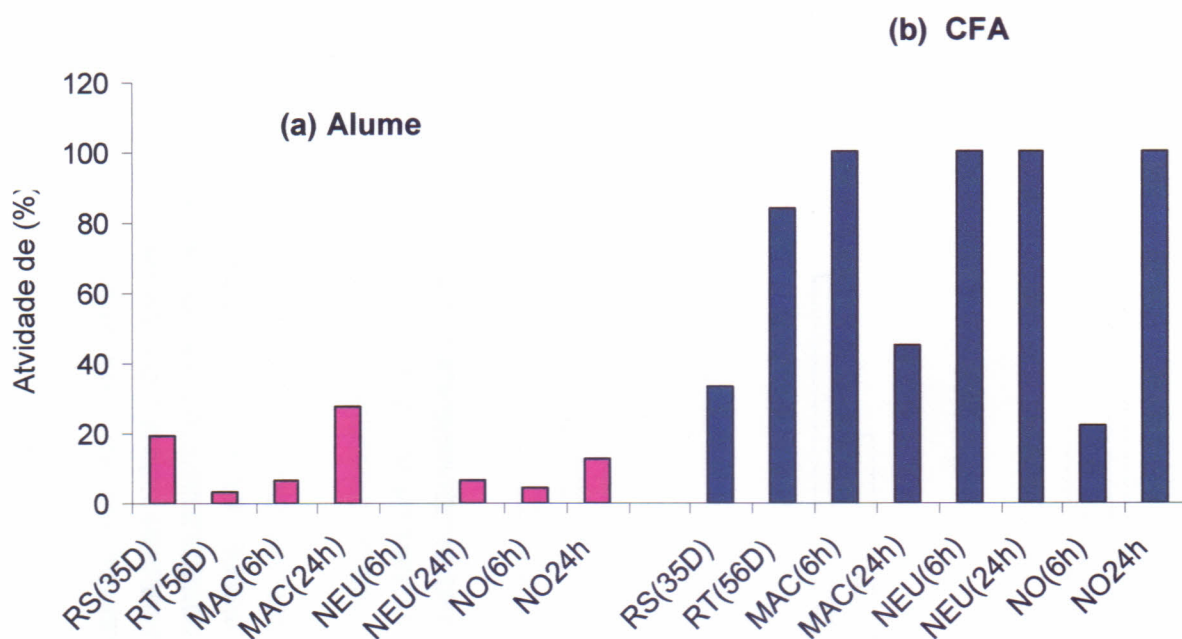


Figura 40 – Efeito do Alume e CFA sobre a resposta imune secundária (RS) e terciária (RT) em camundongos imunizados com 10 μ g de ovalbumina e sobre a resposta inflamatória: (MAC (6 h): migração de macrófagos após 6 h; MAC (24h) migração de macrófagos após 24 h; NEU 6 h: migração de neutrófilos após 6 h; NEU 24 h migração de neutrófilos após 24 h e NO 6 h: produção de óxido nítrico após 6 h NO 24 h: produção de óxido nítrico após 24 h e atividade antioxidante (AOX). (a) Alume - hidróxido de alumínio e (b) CFA- adjuvante completo de Freund)

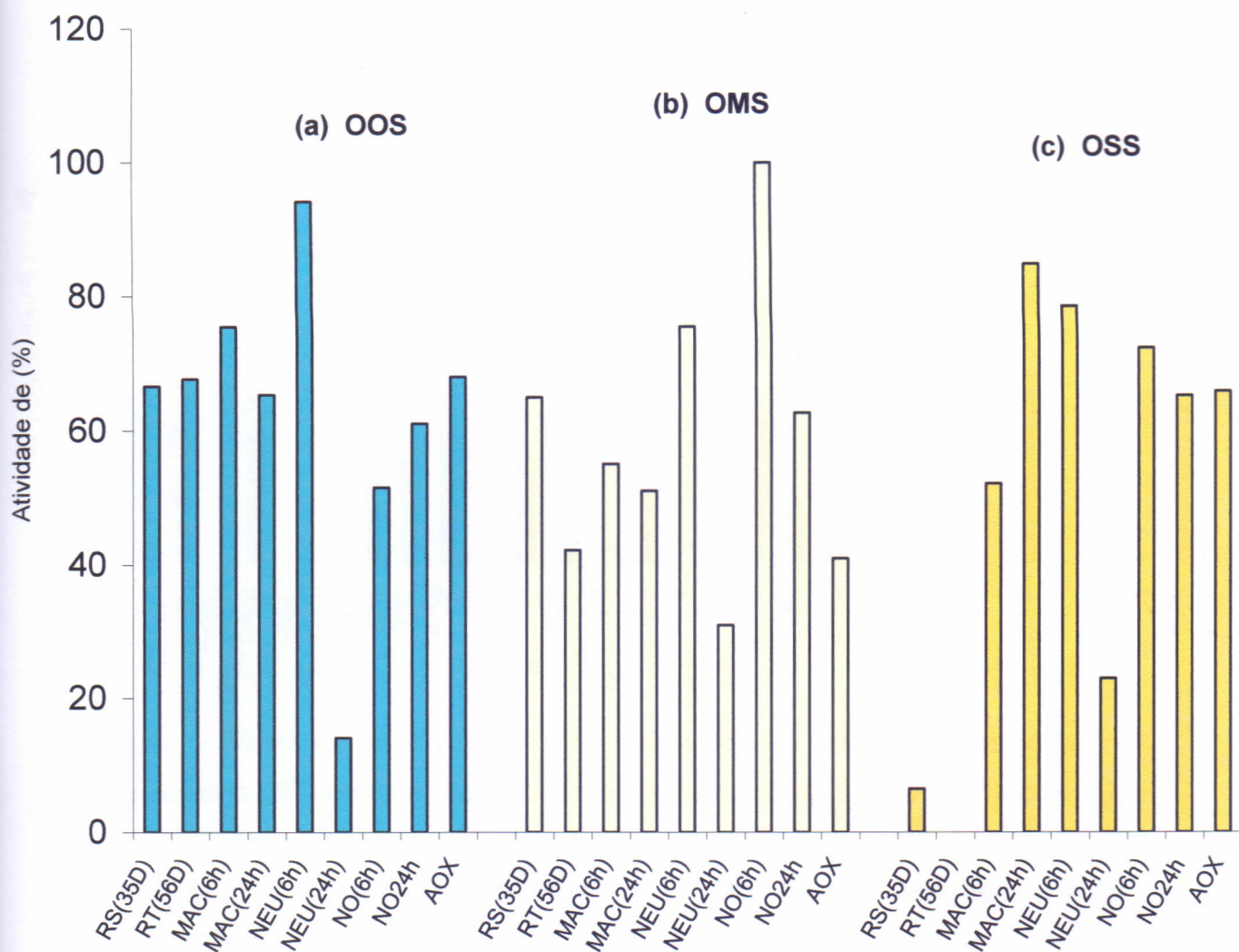


Figura 41 – Efeito dos óleos vegetais de procedência Sigma sobre a resposta imune secundária (RS) e terciária (RT) em camundongos imunizados com 10 μ g de ovalbumina e sobre a resposta inflamatória: (MAC (6 h): migração de macrófagos após 6 h; MAC (24h) migração de macrófagos após 24 h; NEU 6 h: migração de neutrófilos após 6 h; NEU 24 h migração de neutrófilos após 24 h e NO 6 h: produção de óxido nítrico após 6 h; NO 24 h: produção de óxido nítrico após 24 h e atividade antioxidante (AOX). (a) OOS- óleo de oliva Sigma, (b) OMS- óleo de milho Sigma e (c) OSS- óleo de soja Sigma)

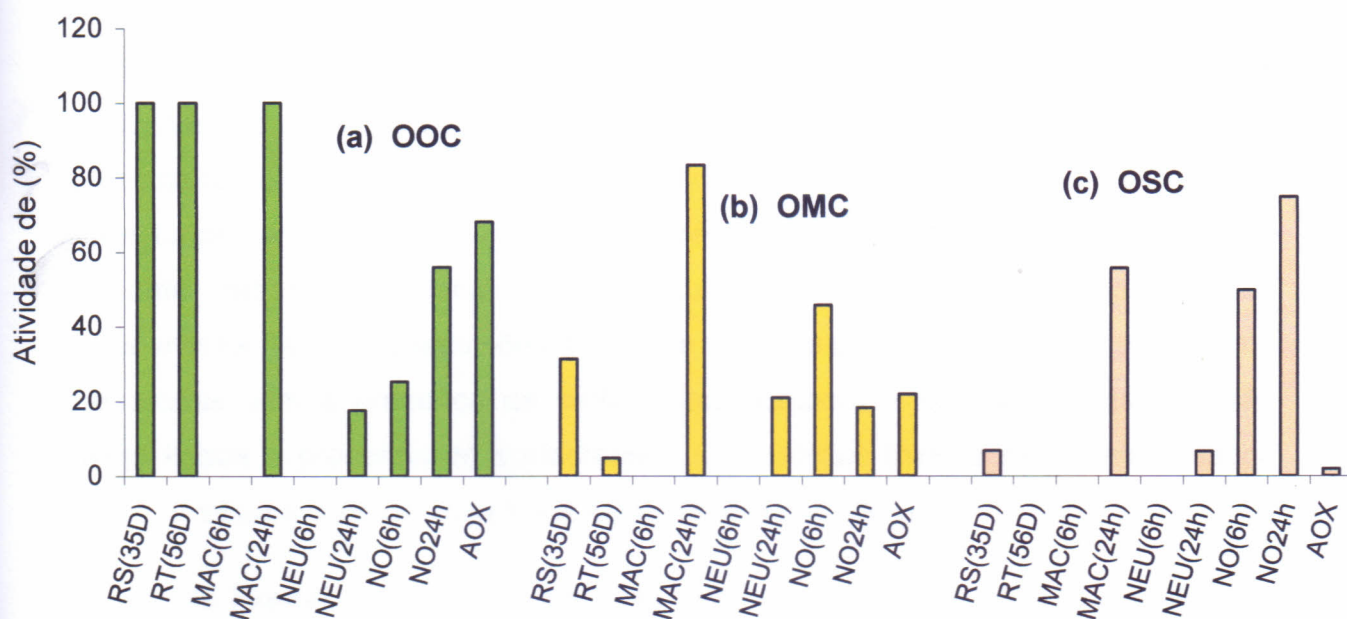


Figura 42 – Efeito dos óleos vegetais comestíveis sobre a resposta imune secundária (RS) e terciária (RT) em camundongos imunizados com 10µg de ovalbumina e sobre a resposta inflamatória: (MAC (6 h): migração de macrófagos após 6 h; MAC (24h) migração de macrófagos após 24 h; NEU 6 h: migração de neutrófilos após 6 h; NEU 24 h migração de neutrófilos após 24 h e NO 6 h: produção de óxido nítrico após 6 h NO 24 h: produção de óxido nítrico após 24 h e atividade antioxidante (AOX). (a) OOC- óleo de oliva comestível, (b) OMC- óleo de milho comestível e (c) OSC- óleo de soja comestível)

5- DISCUSSÃO

A comparação dos efeitos adjuvantes dos óleos vegetais foi analisada em relação à síntese de anticorpos específicos induzidos por ovalbumina isoladamente bem como associada a dois adjuvantes clássicos, $\text{Al}(\text{OH})_3$ e o adjuvante completo de Freund. Embora a literatura tenha mostrado os efeitos indesejáveis dos adjuvantes de natureza mineral (GUPTA *et al.*, 1993), um balanço dos diferentes aspectos de segurança e influência na qualidade da resposta imune vem sendo feito em estudos comparativos para a seleção de novos adjuvantes (ALVING, 2002). No presente trabalho, o efeito adjuvante foi caracterizado em relação ao óleo isoladamente, isto é, as emulsões dos óleos vegetais e do óleo mineral marcol foram preparadas sem a presença de surfactantes. Embora a viscosidade da emulsão esteja ligada à presença de surfactantes, seus efeitos tóxicos estão relacionados com o nível de ácidos graxos (AUCOUTURIER *et al.*, 2001).

Nas Figuras 13, 14 e 15 pode ser visto que o óleo de oliva (comestível ou Sigma) exerceu efeito adjuvante ao longo de todo período de imunização, isto é, nas respostas primárias, secundárias e terciárias. Quanto ao óleo de milho (comestível ou Sigma) ele também teve efeito comparável ao de oliva, mas a cinética foi irregular com tempos em que não exerceu efeito significativo. Já o óleo de soja (comestível ou puro) não teve efeito adjuvante na resposta primária e a secundária variou em relação ao puro e ao comercial. Recentes estudos têm demonstrado que a indução da resposta imune primária antígeno-específica *in vivo*, usualmente requer o uso de um adjuvante (REVETS & BAETSELIER, 2003). Dessa forma, pode-se dizer que o efeito adjuvante mais consistente foi exercido pelo óleo de oliva. O fundamento desse efeito é a liberação lenta do antígeno incorporado ao adjuvante e é esse antígeno que se faz necessário para estimular o sistema imune e produzir altos títulos de anticorpos (FLIES & CHEN, 2003). Por outro lado, os trabalhos de O' HOGAN *et al.*, (2001), mostraram que, diferentes adjuvantes tendem a favorecer tipos específicos de resposta possibilitando a seleção do adjuvante para cada situação.

Na comparação do efeito adjuvante dos óleos vegetais com o do $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Figura 14, 17 e 20) vê-se que o óleo de oliva tem um efeito mais elevado, mais

precoce e mais duradouro que o $\text{Al}(\text{OH})_3$. O óleo de milho (Figura 20) tem efeito mais elevado em resposta primária, mas não tem efeito superior ao do $\text{Al}(\text{OH})_3$ na resposta secundária e a diferença significativa reaparece apenas no fim da resposta terciária. O efeito adjuvante do óleo de soja (Figura 17) foi comparável ao do $\text{Al}(\text{OH})_3$. Também na comparação com o $\text{Al}(\text{OH})_3$ o efeito do óleo de soja afasta-se dos outros dois óleos. Esses resultados estão de acordo com HEM (2003), que mostraram que os sais de alumínio começam a se dissolver após uma hora da injeção, formando o depósito no sítio da injeção e liberando o antígeno lentamente. Segundo AUCOUTURIER (2001), as emulsões de óleo em água usados em vacinação animal protege o animal durante um ano, enquanto o hidróxido de alumínio requer dois reforços ou mais.

Essa peculiaridade desses óleos poderia torná-lo um candidato a ferramenta de estudo da cinética de síntese de determinados isotipos de imunoglobulinas. Já com os óleos de soja a cinética da síntese de anticorpos específica só teve efeito mais elevado do que o alumínio após o segundo reforço.

A comparação dos efeitos adjuvantes dos óleos vegetais com o óleo mineral marcol revelou que os óleos de oliva e de milho têm efeito idêntico ao do marcol e o óleo de soja não teve efeito superior ao do marcol durante todo o período da imunização (Figuras 14, 17 e 20). As emulsões de óleo mineral com óleo não mineral podem ser uma ótima alternativa para aumentar a resposta imune (AUCOUTURIER, 2003). Nos recentes trabalhos de PATIL *et al.*, (2002), a quantidade de anticorpos induzida, e particularmente a dimensão da resposta imune determina a duração da imunidade.

Na comparação com os adjuvantes de Freund (CFA1 e CFA2) nenhum óleo vegetal exerceu efeito adjuvante mais elevado do que o dos adjuvantes de Freund ao longo do período da resposta imune avaliada (Fig. 15, 18 e 21).

Diante dos resultados apresentados, dentre os óleos vegetais, aquele que mostrou melhor capacidade adjuvante foi o óleo de oliva, seguido do óleo de milho, e do óleo de soja. Observou-se que os óleos vegetais mostraram diferentes

peculiaridades ao longo do período de avaliação e segundo BOWDEN *et al.*, (2003), a maior diferença entre os adjuvantes oleosos está relacionado com o título de anticorpos ao longo do tempo.

O efeito adjuvante dos óleos vegetais sobre a síntese específica de anticorpos IgE nos soros dos camundongos imunizados com ovalbumina pode ser observado nas Figuras 24, 27 e 30, onde se constata que o efeito adjuvante de todos os óleos vegetais foi tardio. Entretanto, após o primeiro reforço os óleos induziram síntese específica de IgE, mas na resposta terciária os óleo de milho e soja induziram síntese de IgE com uma frequência superior a do óleo de oliva. Essa característica dos óleos de soja e de milho, estimulando mais frequentemente a síntese de IgE seria um argumento pouco favorável ao uso dos mesmos como adjuvantes na vacinação animal, uma vez que a síntese de IgE poderia induzir sintomas alérgicos indesejáveis (MEKOK & METCALFE, 2000; MARCIANI, 2003; HEMMER *et al.*, 1997). Entretanto, os adjuvante usados em vacinação humana também induzem síntese específica de IgE e de acordo com OKUNUKI *et al.*, (2000), a sensibilização de camundongos para induzir anafilaxia ativa não somente induz uma resposta IgE antígeno-específica, mas também resulta na produção anticorpos do tipo IgG1 antígeno-específica. Cumpre ainda chamar atenção para o fato que a ovalbumina, por si mesma, tem sido responsabilizada pela indução de diferentes reações alérgicas (CREVEL *et al.*, (2000). Como foi abordado por GUPTA *et al.*, (1993), o processamento do antígeno pode ser modulado pelos adjuvantes. Na realidade, ao ser analisado o adjuvante, tem-se que levar em consideração a sua capacidade de induzir síntese de IgE, sabendo contudo, que haverá sempre uma certa síntese deste anticorpo que não poderá ser evitada.

Os óleos de milho, de modo surpreendente, induziram efeito adjuvante durante a resposta secundária semelhante ao do $Al(OH)_3$, conhecido por ser um adjuvante preferencial para a síntese de IgE. Os efeitos do $Al(OH)_3$ sobre a síntese de IgE concordam com os de BAYLOR *et al.*, (2002), onde o hidróxido de alumínio induziu síntese de IgE antígeno-específica promovendo reações alérgicas. Já os óleos de oliva e soja mostraram uma variação ao longo da resposta avaliada. Porém, após o segundo reforço os óleos vegetais têm efeito comparável ao alumínio.

Contudo, na resposta terciária, os níveis de IgE antígeno-específica com o uso dos óleos são inferiores aos do $\text{Al}(\text{OH})_3$. Nos trabalhos de ALVING (2002), foi demonstrado que o uso do alumínio estimula IL-4 e os subtipos de T-helper em camundongos com aumento IgG1 e produção de IgE.

A análise comparativa do efeito adjuvante dos óleos vegetais com o marcol pode ser observada nas Figuras 25, 28 e 31. Da mesma maneira que na comparação com o $\text{Al}(\text{OH})_3$, durante a resposta primária não foi detectada síntese específica de IgE. O óleo de soja teve efeito comparável ao marcol ao longo da resposta avaliada, enquanto os óleos de oliva e milho mostraram variações ao longo da cinética. Apenas o óleo de oliva não teve efeito adjuvante comparável ao do marcol no final da resposta terciária. Chama atenção o fato que, mesmo sem a presença do surfactante o marcol induziu altos níveis de IgE antígeno-específica.

Os óleos vegetais mostraram efeito adjuvante sobre a síntese de síntese IgE específica, em diferente dias da cinética, semelhante ao dos adjuvantes de Freund (CFA1 e CFA2). Porém, no final da resposta avaliada com quatro meses, os óleos induziram níveis de anticorpos IgE específicos inferior ao CFA1. os efeitos indesejáveis associados ao uso do IFA têm sido controlada com o uso de óleos e surfactantes dotados de alto grau de pureza (CHANG *et al.*, (1998)).

Foram também analisados os óleos de diferentes procedências (Comercial e Sigma). No final da resposta terciária foi onde ocorreu diferença na cinética de síntese de IgE e os óleos de soja (Comercial e Sigma) tiveram efeito mais elevado quando comparados com os óleos de oliva e milho (Comercial e Sigma). Essa mesma situação se repete na cinética da síntese de Igs específicas, porém aqui foram os óleos de oliva (Comercial e Sigma) que exerceram efeito mais elevado do que os óleos de soja e milho. Trabalhos recentes de AUCOUTURIER *et al.*, (2001) têm mostrado que para cada tipo de emulsão, a cinética da liberação do antígeno é variada, sendo isto correlacionado com a estabilidade da emulsão.

Como pode ser concluído, o óleo de oliva tem maior efeito adjuvante sobre a síntese de imunoglobulinas (G, A e M) e menor efeito sobre a síntese de IgE que os

óleos de soja e milho. Aparentemente essas características fariam do óleo de oliva um adjuvante preferencial nos protocolos de vacinação.

Após a análise da capacidade imunoadjuvante dos três óleos vegetais, foi feita também uma análise da capacidade inflamatória desses três óleos como uma tentativa para estabelecer uma correlação entre esses dois efeitos. Os efeitos inflamatórios dos adjuvantes têm sido objeto de preocupação de quantos usam os procedimentos de vacinação uma vez que em relação aos animais, por exemplo, uma forte reação inflamatória poderia lesar a pele, muitas vezes preciosa, do animal imunizado (CLASSEN *et al.*, 1992). Contudo resta sempre a esclarecer se a reação inflamatória com a sinalização desencadeada pelas diversas citocinas não seria uma etapa indispensável ao estabelecimento da resposta imune adaptativa (CHIN *et al.*, 1998).

A resposta inflamatória dos óleos, explorada pelo modelo da Bolsa de ar e avaliada pela migração celular, produção de NO e capacidade antioxidante, está discriminada nas Figuras (35, 36, 37, 38 e 39) e na tabela 3, pode ser visto que, de uma maneira geral, os três óleos vegetais tiveram acentuada reação antiinflamatória, quer com 6 h quer com 24 h. Embora, essa ação não tenha sido uniforme pois os óleos de procedência Sigma apresentaram uma atividade inflamatória mais precoce e mais intensa que a do $Al(OH)_3$ do que os óleos comestíveis (Fig. 36), por sua vez, somente o OOP teve efeito inflamatório tão elevado como o CFA. Além disso, somente os óleos de procedência Sigma induziram uma migração significativa de eosinófilo. Aparentemente, os óleos PA apesar do grau de refinamento maior têm apresentado efeitos não só inflamatórios como possivelmente de natureza alérgica, sugerido pela migração de eosinófilos (Fig. 37). Os eosinófilos são conhecidos por expressarem receptores Fc específicos para uma classe denominada IgE, promovendo reações alérgicas. Além disso, apesar do OSC não ter induzido migração de macrófagos com 6 horas, na dosagem de NO ele teve efeito significativo sobre o controle. De acordo com THOMAZZI (2001), o NO tem um papel decisivo na locomoção de eosinófilos.

Alguns autores mostraram a importância da relação entre a estrutura e função dos adjuvantes (MARCIANI,2003; SCHIJNS *et al.*, 2000). Os três óleos vegetais aqui usados foram também avaliados através de sua capacidade de retirar radicais formados no sistema o que mostrou correlação com a presença de compostos com sistemas conjugados. Porém, o óleo de oliva foi o que apresentou propriedades antioxidantes mais elevadas e teve também vários picos relacionados a compostos fenólicos polares e estes compostos podem ser responsáveis por sua maior atividade antioxidante. O óleo de soja Sigma apresentou propriedades antioxidantes semelhantes às do óleo de oliva, apesar dos compostos responsáveis pela capacidade de retirar radicais terem características distintas. A diferença do potencial antioxidante nos óleos de milho comestíveis e Sigma pode ser atribuída à presença dos compostos com sistemas conjugados observados nos tempos de retenção 40.219 e 40.362 min, no respectivo cromatograma (Figuras 11 e 12). Entretanto, esses compostos ainda não foram identificados quimicamente. Com relação à emulsão do óleo de oliva, ela foi a mais estável quando gotejado em água destilada, o que também, poderia estar relacionado com o seu índice de saturação (Silva, 2000).

Os óleos, OOC e OMC e o marcol não induziram acúmulo de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos com 6 horas de RIA, mas provocaram aumento da produção de NO. A produção de nitrito é um método indireto (BALKWILL, 2000) para a dosagem de NO, um gás natural, de curta vida, que atua participando da defesa antimicrobiana (NATHAN,1992). O NO imunologicamente indutível tem sua produção observada não somente em macrófagos, mas também no endotélio, células musculares lisas e hepatócitos, além de fibroblastos (HECKETAL,1992; NATHAN,1992; ROBERTS *et al.*,1992). A BAS é formada por células fagocíticas fibroblastos e juntos com a rede vascular formam uma barreira que retém os produtos da resposta inflamatória (SINET *et al.*,1986). O fato dos óleos comestíveis não ter induzido migração significativa de eosinófilos inicialmente (após 6 h), constitui uma vantagem para seu possível uso nos protocolos de vacinação.

Nas Figuras 40, 41 e 42, foi tentado o estabelecimento de uma correlação entre a resposta imune inata, expressa pela reação inflamatória e a imunidade

adaptativa, expressa pela síntese de anticorpos específicos (imunoglobulinas G, A e M). É sabido que, recentemente vários trabalhos têm abordado a importância da imunidade inata no controle da resposta imune adaptativa (AKIRA *et al.*, 2001; SCHNARE *et al.*, 2001; MARCIANI *et al.*, 2003). Podemos observar que o $Al(OH)_3$ foi o adjuvante que teve menor resposta imunoadjuvante correlacionada com o mais baixo efeito inflamatório (Fig. 40). Já o CFA e os 3 óleos vegetais puros eles tiveram efeito imunoadjuvante correlacionado com a capacidade inflamatória (Fig. 40 e 41). Pode-se assim concluir que existe uma correlação entre resposta imune inata e resposta imune adaptativa. Contudo, devido à variação encontrada nos resultados obtidos segundo os critérios selecionados para avaliar a resposta inflamatória (migração de leucócitos totais, migração de neutrófilos, migração de macrófagos, migração de eosinófilos, produção de NO e capacidade antioxidante dos óleos) não foi possível estabelecer de modo inequívoco uma correlação entre as duas respostas imunológicas. Esses resultados serão ainda submetidos a um modelo estatístico não convencional para que seja feita uma tentativa de esclarecer a possível correlação entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa.

6- CONCLUSÃO

A caracterização bioquímica mostrou que o óleo de oliva foi o que apresentou propriedades antioxidantes mais elevadas e teve também vários picos relacionados a compostos fenólicos polares e estes compostos podem ser responsáveis por sua maior atividade antioxidante. O óleo de soja Sigma apresentou propriedades antioxidantes semelhantes às do óleo de oliva, apesar dos compostos responsáveis pela capacidade de retirar radicais terem características distintas. O óleo de milho apresentou diferença do potencial antioxidante que pode ser atribuída à presença dos compostos com sistemas conjugados observados nos tempos de retenção 40.219 e 40.362 min. No que diz respeito ao efeito imunoadjuvante dos óleos vegetais pode ser concluído, que o óleo de oliva tem maior efeito adjuvante sobre a síntese de imunoglobulinas (G, A e M) e menor efeito sobre a síntese de IgE que os óleos de soja e milho o que faria deste óleo um adjuvante preferencial nos protocolos de imunização/vacinação. De uma maneira geral, os três óleos vegetais induziram acentuada reação inflamatória, quer com 6 h quer com 24 h, embora essa ação não tenha sido uniforme, pois os óleos de procedência Sigma apresentaram uma atividade inflamatória mais precoce e mais intensa que a do $Al(OH)_3$ e a dos óleos comestíveis. No que diz respeito à correlação entre capacidade inflamatória (resposta imune inata) e capacidade imunoadjuvante (resposta imune adquirida) pode-se concluir que existe uma correlação entre estas respostas. Porém, devido à variação encontrada nos resultados obtidos, segundo os critérios selecionados para avaliar a resposta inflamatória (migração de leucócitos totais, migração de neutrófilos, migração de macrófagos, migração de eosinófilos, produção de NO e capacidade antioxidante dos óleos), não foi ainda possível estabelecer, de modo quantitativo e preciso, a correlação entre as duas respostas imunológicas.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEREM, A & ULVETICH, J.(2000) Toll-like receptors in the induction of innate immune response. **Nature**. 406:782-787.

ALVING, CARL, R. (2002) Design and selection of vaccine adjuvants: Animal models and human trials. **Vaccine**. 20; S56 - S64.

AKIRA & SHIZUO; KIYOSHI; TAKEDA, KIYOSHI; KAISHO, TSUNEYASU.(2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature immunology**. 2: 675-679.

AUCOUTURIER, J; DUPIS, L & GANNE, V. (2001) Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. **Vaccine**. 19:266-2672.

AUCOUTURIER, J. (2003) Montanide ISA 720 and Montanide ISA 51: water in oil (w/O) emulsions dedicated for human use.**Vaccine**. 21:3520-3521

AUDIBERT, FRAÇOISE. (2003) Adjuvants for Vaccine, a quest. **Internacional Immunopharmacology**. 3:1187-1193.

AUDIBERT, F.M & LISE, L.D. (1993) Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. **IMMUNOL. Today**. 14:281-284.

BALKWILL, F., 2000. **Cytocine cell biology – A Practical approach**. Oxford University Press, New York. Cap.8, 254p.

BARBIOR, B. M; KIPNES, R. S; CURNUTTE, J. T. (1973) Biological defense mechanisms: The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. **J. Clin. Invest.** 52:741-4.

BAUMAN, H; GAULDIE, J. (1994) The acute phase response. **Rev. Immunology Today**. 15(2):74-80.

BAYLOR, NORMAN W; EGAN, W; RICHMAN, P. (2002) ALUMINUM SALTS IN VACCINES- US PERSPECTIVE. (2002). **Vaccine**. **20**:s18-s23.

BECHER, P. (1965a.) Testing and emulsion properties. Emulsions: Theory and Practice. **Reinhold**. **2^a** ed. New York, p.381.

BECHER, P. (1956b.) Physical properties of emulsions. Emulsions: Theory and Practice. **Reinhold**. **2^a** ed. New York, p.381.

BOGDAN, C; ROLLINGHOFF, M & DIEFENBACH, A. (2000) Mast cells, Basophils, and Eosinophils: Distinct but Overlapping Pathways for Recruitment. **Immunological Reviews**, **179**:5-15.

BOWDEN, T. J; ADAMSON, K.; MACCLACHLAN, P; CAMPBELL, P.C & BRICKNELL, I.R. (2003) Long-term study of antibody response and injection-site effects of oil adjuvants in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) **Immunology**. **14**:363-369.

BROWN, E. J., LINDBERG, F. P., 1996. Leukocyte adhesion molecules in host defence against infection. **Annals of Medicine**,**28**: 201-208.

BUTCHER, E.C. (1991). Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) to specificity and diversity. **Cell**. **67**: 1033-1037.

CHIN, J. & GIL, F.S. (1998) Skin Delivery of a Hybrid Liposome / ISCOM Vaccine Implicates a Role for Adjuvant in Rapid Modulation of Inflammatory Cells Involved In Innate Immunity Before the Enhancement of Adaptive Immune Response. **Immunol. Cell. Biol.** **76**:245-255.

CLARK, M.J.P; GILROY, D.W; WILLIS, D; WILLOUGHBY, D. A & TOMLINSON, A. (2001) Nitric Oxide Synthase Inhibitors Have Opposite Effects on Acute Inflammation Depending on Their Route OF Administration. **The Journal of Immunology**. **166**:1169-1177.

CLASSEN, E; LEEUW, W; GREEVE, P; HENDRIKSEN, C. & BOERSMA, W. (1992) Freund's Complete Adjuvant: an effective but disagreeable formula. **Resp. Immunology**. **143**:478-483.

CLEMENTS, C.J & GRIFFITHS, E. (2002) The global impact of vaccine containing aluminium adjuvants. **Vaccine**. **20**:S24-S23.

CREVEL, R. W. R; KERKHOFF, M. A. T & KONING, M. M. G. (2000) Allergenicity of Refined Vegetable Oils. **Food and Chemical Toxicology**. **38**:385-393.

CHANG, JENNIE, C. C; DIVELY, JOCELYN P; SAVARY, JAY R & JENSEN, FRED C. (1998) Adjuvant activity of incomplete Freund' s adjuvant. **Advanced Drug Delivery reviews**. **32**:173-186.

CONTRAN, R.S.; KUMAR, V., COLLINS, P. (1999) Robbins Pathologic Basics of Disease. 6a.ed, **Saunders Company**, New York. cap III 48-83p.

COX, J. C; & COULTER, A.R. (1997) Adjuvants – a classification and review of thier modes action. **Vaccine**. **15**:248-256.

CUNHA, F. Q. & FERREIRA, S. H., 1986. The release of a neutrophil factor from peritoneal macrophage by endotoxin : inhibition by glucocorticoids. **European Journal Phamacology**, **29** (1-2): 65-76

DAVIES, GWYN. (2003) OM-174 and OM- triacyl adjuvants maturation of dendritic cells in vitro and in vivo. **Vaccine**. **21**:3504-3505

DRANE, DEBBIE. & PEARSE, MATIN. (2003) The ISCOM technology: further developments. **Vaccine**. **21**:3510-3511.

EDELMAN, R; TACKET, CO. (1990) Adjuvants. **Intern. Rev. Immunol**. **7**:51-66.

EDELSON, P.J. (1980) Monocytes and macrophages: aspects of their cell biology. In: Handbook of inflammation weissmann, G. (Ed). **Elsevier**. 469-495 pg.

EDWARDS, J.C.W., A. D. SEDGWICK & D.A WILLOUGHBY (1981) The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air. An in vivo tissue culture system. **Journal of Pathology**, 134: 147-156.

ENGERS, HOWARD; KIENY, MARIE PAULE; MALHOTRA, PAWAN & PINK, J. RICHARD. (2003) Third meeting on Novel Adjuvants Currently in or Close to Clinical Testing World Health Organization-Organisation Mondiale de la Santé, Fondation Mérieux, Annecy, France, 7-9 January 2002. **Vaccine**.21:3503-3524.

ELOUZ, F; ADAM, A; CIOBARU, R & ; LEDERER, E. (1974) Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. **Biochem Biophys Res Commun**. 59:1317-1325.

FANTONE, J. C. & WARD, P. A..(1982) A review: role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. **American Journal of Patholog**. 107: 395-418.

FARBER, J.L. (1982) Biology of disease: membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. **Lab Investigation**, 47(2): 114-23.

FERREIRA, S.H. (1980) Are Macrophages the bodys alarm cells? **Agents Actions**. 10:229-230

FILES, DALLAS B. & CHEN, LIEPING. (2003) A simple and rapid vortex metyhd for preparing antigen/adjuvant emulsions for immunization. **Journal of Immunological Methods**. 276:239-242.

FRAUWIRTH, K. A. & RONCHESE, F. (1999) The role of B7 costimulation in T-cell immunity. **Immunol. Cell. Biol**. 77:304-311.

FRAUIWIRTH, K.A & THOMPSON, C.B. (2002) Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. **J.Clin.Invest**. 109:295-299.

FREUND, J.; CASALS, J.; HOSMER, E.P. (1937) Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 37: 509-516.

GAHBERG, C.G; VALMU, L; TIAN, L; KOTOVUORI, P; FAGERHOLM,

KOTOVUORI, A; KANTOR, C. And HILDEN, T. (1999) Leukocyte Adhesion- a Fundamentalk PROCESS IN leukocyte Physiology. **Bras. J. Med. Biol. Res;** 32(5):511-517.

GALLUCC, S; LOLKEMA, M; MATZINGER, P. (1999) Natural adjuvants; endogenous activators of dendritic cells. **Nat. Med.** 5:1249-1255.

GLENNY, A. T; POPE, C. G & WALLACE, WADDINGTON H. XXII- (1926) The antigen value of toxoid precipitated by potassium alum. **J. Pathol Bacteriol.** 29:38-39.

GREEN, L. C., WAGNER, D.A., GLOGOWSKI, J., SKIPPER, P. L., WISHNOK, P. S., TANNENBAUM, S. R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrite in biological fluids. **Analytical Biochemistry.** 126: 131-138.

GUPTA,C.K. (1993) Adjuvants- a balance between toxicity and adjuvanticity. **Vaccine** 11(33): 293-306.

HALLIWELL, B.(1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: cause or consequence? **Lancet**, 344-721.

HARMAN, D. (1989) Prolongation of life: Role of free radical reaction in ageing. **J. M. Geriatr. Soc.** 17: 721-732.

HARRIS, N. & ROCHESE, F. (1999) The role of B7 costimulation in T-cell immunity. **Immunol. Cell. Biol.** 77:304-311.

HECK, D. E., LASKIN, D. L.,GARDNER, C. R., LASKIN, J. D.,1992. Epidermal growth factor suppresses nitric oxide and hydrogen peroxide production by

keratinocytes. Potencial role for nitric oxide in the regulation of wound healing. **Journal of Biological Chemistry**, 267:21277.

HEM, S. (2002) Elimination of aluminum adjuvants. **Vaccine**. 20:s40-s43.

HEMMER, W; FOCKE, M; WANTKE, F; JAGER, S; GOTZ, M. & JARISCH, R. (1997) Oilseed rape pollen is a potentially relevant allerg. **Clin. Exp.. Allergy**. 27:156-161.

HILLEMANN, M.R; (1967) Considerations for safety and application of emulsified oil adjuvants to viral vaccines. In: REGAMY, R.H; HENNESSEN, W; IKIE, D. & UNGER, J. (Eds), SYMPOSIA Series in Immunobiological Standardization. Vol. 6, Internacional Symposium on Adjuvants of Immunity, S, Karger, New York, p . 18.

O' HAGAN, D.T; MACKICHAN, M. L . AND SINGH, MANMOHAN. (2001) Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. **Biomolecular Engineering**.18:69-65.

HOURIHAN, H., ALLEN, T.D., & AGER, A, 1993. Lymphocyte migration across high endothelium is associated with increases in $\alpha 4\beta 1$ integrin (VLA-4) affinity. **Journal of Cell. Science**, 104: 1049-1059.

IBAÑEZ, O.M.; STIFFEL, C.; RIBEIRO, O.G.; CABRERA.W.K.; MASSA, S.; FRANCO, M.; SANT'ANNA, O.A.; DECREUSEFOND, C.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M. & BIOZZI, G. (1992) Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory. **Eur. J. Immunol**. 22:2555-2563.

IMHOF, B. A. & DUNON, D. (1995) Leukocyte migration and adhesion. **Advances in Immunology**.58: 345-416.

IMHOF, B.A. & DUNON, D. (1997) Basic mechanism of leukocyte migration. **Horm. Metab. Res**. 29: 614-621.

JOHNSON, A. G; GAINES, S; LANDY, M. (1956) Studies on the o antigen of salmonella typhosa V. Enhancement of antibody response to protein antigen by the purified lipopolysaccharide. **J. Exp. Med.** 103:225-246.

KAARNETY, E.R; PAPE, KA; LOH, DY & JENKINS, M.K. (1994) Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. **Immunity.** 1:327-339.

KAWABE, Y & OCHI, A. (1991) Programmed cell death and extrathymic reduction of V β 8⁺ CD4⁺ T Cells in mice tolerant to Staphylococcus aureus enterotoxin B. **Nature.** 349:245-248.

KENSIL, CHARLOTTE READ. (2003) QS-21 formulations and derivatives: influence on innate and adaptive immunity. **Vaccine.** 21:3503

KILBOURN, R.G., GROSS, S. S., JUBRAN, A., ADAMS, J., GRIFFITH, O. W., LEVI, R., LODATO, R. F. (1990) N^G-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America.** 87: 3629.

KIMURA, J; NARIUCHI, H; WATANABE, T; MATUHASI, T; OKAYASU, I. & HATAKEYAMA, S. (1978). Studies on the adjuvant effect of water-in-oil-in-water emulsion in sesame oil. I. Enhanced and persistent antibody formation by antigen incorporated into the water-in-oil-in-water emulsion. **Jpn. J. Exp. Med.** 48:149

KNIGHT, J.A. (1995) Disease related to oxygen-derived free radicals. **Annals Clinical Laboratory Science.** 25(2): 111-21.

KOLB, H., KOLB-BACHOFEN, V. (1998) Nitric oxide in autoimmune disease: cytotoxic or regulatory or regulatory mediator? **Immunology Today,** 19: 556-561.

KOSHLAND, D. E., 1992. The Molecule of the year. **Science,** 1258-1261

KOWALCZK, D.W. & ERTL, H.C.J. (1999) Immune responses to DNA. Vaccines. **Cell. Mol. Life Sci.** 55:751-770.

KUO , P. C., SCHROEDER, R. A.. (1995) The emerging multifaceted roles of nitric oxide. **Annals of Surgery**. 221:220-235.

LISSANT, K .J .L. (1984) Emulsions and emulsions technology, part III. In: LISSANT,K.J. editor. Surfactant Science Series. Vol.6. 206—210 pg

LUBEC, G. 1996. The hydroxyl radical: from chemistry to human disease. **Journal of Investigation Medical**, 44(6): 324-46.

MACMICKING, J., XIE, Q. W., NATHAN, C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**. 15: 323-50.

MACKAY, C,R; MARSTON, W. I.; DUDLER, I; SPERTINI, O; TEDDER, T. F; HEIN, W.R. (1992) Tissue-specific migration pathways by phenotypically distinct subpopulations of memory T cells. **Eur. J. Immunol**. 2:887.

MALHOTRA, RAJNEESH; MERRY, TONY; RAY, KEITH P. (2000) Innate immunity; a primitive system in humans. **Immunology Today**. 21(11): 34-35.

MARCIANI, DANTE J.(2003) Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. **Therapeutic focus**. 8: 934-943

MANJARI, V., SURESH, Y., SAILAJA, D. M. M., DAS, U. N..(2001) Oxidant stress, antioxidant and essential fatty acids in south Indian vegetarian and non-vegetarian. **Prostaglandins Leukocytes Essential Fatty acids**. 64(1): 53-59.

McGUINNESS, DAVID H; DEHAL, PRABBJYOT & PLEASS, RICHARD J. (2003) Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. **Trends Parasitology**. 19(7):312-318.

MEDZHITOV, RUSLAN & JANEWAY JR^B. (2000) How does the system distinguish self from nonself?. **Immunology**. 12:185-188.

MEDZHITOV, R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**. 1:135-136.

MEKON, Y. A. & METCALFE, D. D. (2000) Mast cells innate immunity **.Immunological Reviews. 173:131-140.**

MELLO, A. P. (1982) The use of oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine in endemic areas. **Bol. Centro Panamericano Febre Aftosa. 45:33-42.**

MURPHY, K.M. & REINER, S. I. (2002) The lineage decisions of helper T-cells. **Nat.Rev.Immunol. 2:933-944**

MEHTA, J. L., LOPEZ, L. M., CHEN, L., COX, O. E. (1994) Alterations in nitric oxide syntase activity, superoxide anion generation, and platelet aggregation in systemic hypertension, and effects of celiprolol. **American Journal of Cardiology, 74: 901-905.**

MITCHELL, THOMAS T; HILDEMAN, DAVID; KEDL, ROSS M; TEAGUE, T. KENT; SCHAEFER, BRIAN C; WHITE, JANICE; ZHU, YANAN; KAPPLER, JOHN . & MARRACK, PHILIPPA. (2001) Immunological adjuvants promote activated T cell survival via induction of Bcl-3. **Nature Immunology. 2(5): 397-402.**

MORETO, E.(1998) Tecnologia de Óleos e Gorduras.ed. Varela.150 pg.São Paulo. MURRAY, R; COHEN, P & HARDEGREE, M. C. (1972) Mineral oil aadjuvants: biological and chemical studies. **Ann. Allergy. 30:146.**

NATHAN, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J. 6: 3051.**

NIKI, E., SAITO, KAWAKAMI, A., KAMIYA, Y., 1984. Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. **Journal of Biological Chemistry, 259: 4177-4182.**

NORMAN, W. BAYLON; EGAN, WILLIAM & RICHMAN, PAUL. (2002) Aluminum salts in vaccines-US perspective.**Vaccine. 20:s18-s23.**

O' HAGAN, DEREK T; MACKICHAN, MARY LEE. & SINGH, MANMOHAN. (2001) Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. **Biomolecular Engineering**. **18**:69-85.

O'SHEA, J.J; AVERIL, MA. & LIPSKY, P.(2002) Cytokines and Autoimmunity. **Nature Reviews Immunology**. **21**:37-45.

OWEN, R.W; GIACOSA, A; HULL, W.E; HAUBNER, R; SPIEGELHALDER, B, BARTSCH, H. (2000) The antioxidant / anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. **European Journal of Cancer**.**36**:1235-1247.

PANARO, M. A., ACQUAFREDDA, A., LISI, S., LOFRUMENTO, D. D., MITOLO, V., SISTO, M., FASANELLA, A., TROTTA, T., BERTANI, F., CONSENTI, B., BRANDONISIO, O. (2001) Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infatum promastigotes*. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**. **24**:187-195.

PARKIN, J.& COHEN, B. (2001) An overview of the immune system . **LANCET**. **357**:1777-1789.

PATIL, P. K; BAYRY, J; RAMAKRISHNA,C; HUGAR, B; MISRA, . D; NATARAJAN, C. (2002) Immune responses of goats against foot-and -mouth disease quadrivalent vaccine :comparison of double oil emulsion and aluminium hydroxide gel vaccines in eliciting immunity. **Vaccine**. **20**:2781-2789.

PODDA, AUDINO. (2003) Overview of the clinical use of MF59 adjuvant. **Vaccine**. **21**:3519.

PINOY, LE MOINIC. (1916) Les vaccines en emulsion dans les corps gras ou lipovaccines. **Compt. Rend. Soc. Biol**.

PRESS, J.B. (2000) Structure/function relationships of immunostimulating saponins. **Stud. Nat. Prod.Chem**. **24**:131-174.

RAMON, G. (1925) Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique. **Bull. Soc. Centr. Med.Vet.** 101: 227-234.

RAMON, G. (1926) Procedres pour acroitre la production des antitoxines. **Ann Inst Pauster** . 40:1-10.

REMICK, D. G. & VILLARETE, L, 1996. Regulation of cytokine gene expression by reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates. **Journal of Leukocyte Biology**, 59 (4): 471-475.

ROBERTS, A. B., VODOVOTZ, Y., ROCHE, N. S., SPORN, M. B., NATHAN, C., 1992. Role of nitric oxide antagonist effects of TGF- β and on the beating rate of cultured cardiac myocytes. **Molecular Endocrinology**, 11:1921.

REVEST, HILDE .& BAETSELIER, PATRICK DE. (2003) Lipoprotein I from *P. Aeruginosa*: Th1 inducing natural adjuvant for protein antigens. **Vaccine**. 21:3507-3508.

RADOMSKI, M. W., PALMER, R. M., MONCADA, S., 1990. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not constitutive, nitric oxide sintase in vascular endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, 87: 10043-10047.

ROSSI, A. G., HELLEWELL, P.G., 1994. **Mechanism of Neutrophil accumulation in tissues**. In Hellewell, P. G., Williams, T. J.(eds). Academic press, London, 223-243.

ROJO, J. A; PERKINA, E; G. J. A. M. **Oil. Chem.Soc** 1987 **63**(3), 414.

SALVEMINI, D., RILEY, D. P., CUZZOCREA, S., 2002. Sod mimetics are coming of age. **Nature Reviews- Drug discovery**, 1: 367-374.

SATTHAPOM, S. & EREMIN, O. (2001) Dendritic cells (I): biological functions. *J.R.Coll. Surg.Edinb.* **46**:9-20.

SIMON, H. U. (2001) Regulation of eosinophil and neutrophil apoptosis-similarities and differences. *Immunological Reviews.* **179**:156-162.

SINET, Y. M., SEDGWICK, A. D., CHEA, E. P., WILLOUGHBY, D. A., 1986. Mast cells in newly formed lining tissue during acute inflammation a six day air pouch model in the mouse. *Annals of the rheumatic Disease*, **45**(10): 873-877.

SING, MANMOHAN & Q'HAGAN, DEREK T. (2003) Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Internacional. Journal for Parasitology.* **33**:469-478.

SEDGWICK, D & WILLOUGHBY, D.A. (1985) Initiation of inflammatory response and its prevention. In: Bonta, I.L; Bray, M. A & Parnham, M.J. (eds). *Handbook of inflammation*. Elsevier. 5:27-47.

SCHIJNS, VIRGIL E.J.C. (2000) Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Current Opinion in immunology.* **12**:456-463.

SCHNARE, MAKUS; BARTON, GREGORY, M; HOLT, AGNIESZKA CZOPIK, TAKEDA, KIYOSHI, AKIRA. & MEDZHITOV, RUSLAN. (2001) Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nature immunology.* **2**(10):947-950.

SPRINGER, T.A. (1995) Traffic signals on endothelium lymphocytes and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.* **57**:827-872.

STUERH, D. J., CHO, H. J., KWON, W. S., WEISE, M. F. NATHAN, C.F. (1991) Purification and characterisation of cytokine inducible macrophage nitric oxide synthase, an FAD & FMN- containing proteins. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America.* **88**: 7773-7777.

SUSCHECK, C., ROTHE, H., FEHSEL. K., ENEZMANN, J., KOLB, B. V. (1993) Induction of a macrophage-like nitric oxide syntase in cultured rat aortic

endothelial cells. IL- 1 β mediated induction regulated by tumor necrosis factor α and IFN- γ . **Journal of Immunology**. 151: 3283-3291

STRAW, B.E; MACLACHLAN N.J; CORBETT, WT; CARLER, PB & SCHEY, H.M. (1995) Comparision of tissue reactions produced by Haemophilus pleuropneumonia vaccines made with six different adjuvants in swine. **Can.J. Comp.Med.**49:149-151.

TENGERDY, R. P & LACETERA, N. G. (1991) Vitamin Eadjuvant formulations in mice. **Vaccine**. 9:204-205.

THOMAZZI, SARA M; FERREIRA, HELOISA, H.A; CONRAN, NICOLA; NUCCI, GILBERTO DE. & ANTUNES, EDSON. (2001) Role of nitric oxide on in vitro human eosinophil migration. **Biochemical Phamacology**. 62:1417-1421.

VERDIER, F. (2003) Aluminium and macrophagic myofascilitis: status of the issue and rewie of the ongoing epidemiological and non-clinical studies. **Vaccine** 21:353518-3519.

VERRASTRO, T., LORENZI, T. F., NETO, S. W., 2002. **Hematologia e hemoterapia: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica**. Editora Ateneu, São Paulo,303p.

VERDOLIN, B.A, FICKER, S.M; FARIA, A.M.C, VAZ, N.M & CARVALHO C.R. (2001) Stabilization of serum antibody responses triggered by initial mucosal contact with the antigen independently of oral tolerance induction. **Brazilion journal of Medical and Biological Research**. 34:211-219.

VOGEL, F.R & POWEL, M.F. (1995) A compedium of vaccine adjuvants and excipients. In: Powell, M.F.& NEUWMAN, MJ (eds). **Vaccine Design**. New York:Plenum Publishing. Pp.1-4.

YAMANAKA, M; HIRAMATSU, K; HIRAHARA, T; OKABE, T; NAKAI, M, SASAKI, N. & GOTO, N. (1992) Pathological studies on local tissue reactions in

guinea pigs and rats caused by four differentv adjuvants. **J. Vet. Med. SCI.** 54:685-692.

ZAMZE, S.(2002) Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor. **J.Biol.Chem.**277:41613-41623.

ZURIER, R.B. (1993) Fatty Acids, Inflammation and Immune Responses Prostaglandins Leukot Esset. **Fatty Acids 48** (1) 57-62.