UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Apresentação de antígenos e liberação controlada como
ferramentas para melhoramento de vacinas de segunda geração

Tese de doutorado

Wagner Quintilio

Orientador: Dr Isaías Raw

SÃO PAULO

2005

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Q7a Quintilio, Wagner
Apresentação de antígenos e liberação controlada como
ferramentas para melhoramento para vacinas de segunda
geração / Wagner Quintilio. -- São Paulo, 2005.
85p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Raw, Isaías

1. Proteína : Bioquímica I. T. II. Raw, Isaías, orientador.

574.19245 CDD

“Apresentação de antígenos e liberação controlada como ferramentas para melhoramento para vacinas de segunda geração”

WAGNER QUINTILIO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado(a) por:

Prof. Dr. ISAÍAS RAW
BUTANTAN
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. PEDRO SOARES DE ARAUJO
IQ - USP

Prof. Dr. LUIS CARLOS DE SOUZA FERREIRA
ICB - USP

Prof. Dr. JOSÉ ABRAHÃO NETO
FCF - USP

Prof. Dr. OSVALDO AUGUSTO BRAZIL ESTEVES SANT'ANNA
BUTANTAN

SÃO PAULO
16 DE NOVEMBRO 2005

Aos meus queridos pais e irmãos,
Em agradecimento pelo apoio irrestrito em todos estes anos

AGRADECIMENTOS

Muitas são as pessoas às quais eu devo meus mais profundos agradecimentos nesses anos de desenvolvimento da tese. Abaixo cito aquelas que contribuíram mais intensamente, no entanto é certo que muitos, mas muitos outros que não serão citados aqui tiveram uma importância muito maior do que imaginam e contam com meus sentimentos de gratidão sincera.

- Ao Prof Dr. Isaías Raw, pelo apoio e exemplo de cientista.
- À Dra Maria Helena Bueno da Costa, pelas idéias.
- À Maria Isabel Esteves, pelas longas discussões e pela revisão do manuscrito.
- À Ivone K. Yamaguchi, pelo apoio no Controle.
- À Hisako Gondo Higashi, pelo apoio e pela confiança.
- À Maria José da Silva Leme, por ter “segurado as pontas”, nos testes de rotina.
- Ao amigo Ricardo Amaral Georgini, o grande macaco-gordo-quebrador-de-galhos.
- Ao Dr Osvaldo Augusto Sant’anna, pelos testes com camundongos e pelas valiosíssimas discussões.
- Às queridas amigas Dra Rosamaria Wu Chia Li e Dra Fernanda Ferraz Camilo Bazito, cujas amizades fizeram a diferença.
- Aos colegas José Augusto Ferraz e Márcia de Moraes e os colegas do Controle de Qualidade, pela ajuda nos experimentos com cobaias e camundongos.

Um agradecimento especial para Jocimara A. M. Namur, Dra Rugimar Marcovitz, Josefina Farina Moraes e ao amigo Jander Temístocles de Oliveira.

Pessoas que eu nunca poderia deixar de citar: Carla Lílian de Agostini Utescher, Nilza Gomes da Silva e Maria de Fátima dos Santos.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1.1
Adjuvantes.....	1.3
Micropartículas Biodegradáveis.....	1.5
Vacinação contra difteria e tétano.....	1.6
Objetivos.....	1.10
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	2.1
Materiais.....	2.1
Métodos.....	2.3
Métodos analíticos	
1. Dosagem de proteína pelo método de Lowry (micrométodo).....	2.3
2. Espectroscopia no ultravioleta.....	2.3
3. Cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC.....	2.3
4. Dicroísmo circular (CD).....	2.3
5. Medidas de fluorescência.....	2.4
6. ELISA de captura - ELISA Lf.....	2.4
7. Determinação do limite de floculação – Lf.....	2.4
8. Dosagem de lactato.....	2.5
9. Microscopia eletrônica de varredura.....	2.5
10. Dosagem de Ponceau S.....	2.5
11. ToBI (<i>Toxin Binding Inhibition assay</i>).....	2.6
12. ELISA de soros de camundongos.....	2.6
Métodos preparativos	
13. Ultraconcentração de proteína na vacina dT pré-formulada.....	2.7
14. Estabilidade das anatoxinas em função do pH.....	2.7
14.1. Influência do tempo de permanência da proteína em pH ácido.....	2.7
14.2. Influência do pH na conformação estrutural das anatoxinas.....	2.8
15. Liofilização.....	2.8
16. Preparo de microesferas de PLGA.....	2.8
17. Estudo fatorial para o desenho de partículas com tamanhos definidos...	2.8
18. Preparo de microesferas contendo vacina dT.....	2.9

19. Determinação da concentração de proteína encapsulada.....	2.10
20. Determinação da antigenicidade das proteínas encapsuladas.....	2.10
21. Cinética de liberação <i>in vitro</i> das anatoxinas encapsuladas.....	2.10
21.1 Efeito dos produtos de degradação da matriz polimérica sobre a estabilidade das proteínas encapsuladas.....	2.10
21.2 Cinética de liberação <i>in vitro</i> das anatoxinas encapsuladas - ensaio cumulativo.....	2.11
22. Indução da formação de anticorpos anti-DTxd e anti-TTxd em animais..	2.11
22.1 Comparação da MSdT com a vacina livre.....	2.11
22.2 Comparação da MSdT com a vacina em gel de Al(OH) ₃ em camundongos.....	2.12
22.3 Efeito da via de imunização na resposta induzida por MSdT em comparação com vacina dT livre.....	2.13
22.4. Comparação da MSdT com a vacina em gel de Al(OH) ₃ em cobaias...	2.14
23. Análise estatística.....	2.15
 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 3.1
Efeitos dos parâmetros do processo de produção sobre o tamanho das partículas de microesferas de PLGA.....	3.1
Dificuldade da encapsulação de proteínas, a questão da diluição.....	3.6
Encapsulação da vacina - perda de atividade durante o processo de produção de microesferas.....	3.6
Cinética de liberação <i>in vitro</i> : interferência da queda do pH e da temperatura - Análise estrutural das vacinas.....	3.12
Experimentos <i>in vivo</i>	3.27
Comparação do efeito adjuvante da MSdT com a vacina dT livre e do intervalo de tempo para aplicação da dose de reforço.....	3.27
Comparação do efeito adjuvante da MSdT com a vacina dT adsorvida em gel de Al(OH) ₃ e do intervalo de tempo para aplicação da dose de reforço...	3.31
A. Detecção de anticorpos neutralizantes por ToBI.....	3.31
B. Detecção de anticorpos circulantes (IgG ₁ e IgG _{2a}) por ELISA.....	3.33

Efeito da via de imunização na resposta induzida por MSdT em comparação com vacina dT livre.....	3.36
Comparação da MSdT com a vacina em gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ em cobaias.....	3.44
4. CONCLUSÃO.....	4.1
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	5.1
6. ANEXO	6.1

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Número de artigos publicados em revistas internacionais sobre adjuvantes para vacinas nos últimos 20 anos.....	1.2
Esquema 1. Estrutura da toxina tetânica.....	1.8
Figura 2. Micrografia eletrônica de varredura das microesferas produzidas no ponto experimental 2.....	3.2
Figura 3. Superfície de resposta dos efeitos da concentração de PVA e da velocidade de agitação da segunda emulsão sobre o tamanho das microesferas de PLGA.....	3.4
Figura 4. Diâmetros calculados a partir da equação (1) em função dos valores de diâmetro observados.....	3.4
Esquema 2. Processo de produção de microesferas de PLGA.....	3.7
Figura 5. Curvas padrão de ELISA de captura para anatoxinas diftérica.....	3.10
Figura 6. Cinética de liberação de lactato e de variação de pH em função do tempo.....	3.13
Figura 7. Perfil de eluição típico por HPLC em coluna QC-PAK GFC 300 (0,6 mL/min). Detecção por medida de absorbância a 280 nm.....	3.14
Figura 8. Perfis de eluição dos sobrenadantes das amostras de MSdT em função do tempo.	3.15
Esquema 3. Esquema de degradação de PLGA em meio aquoso.....	3.16
Figura 9. Variação de pH em função do tempo da suspensão de MS e de vacina dT livre.....	3.17
Figura 10. (A) Espectro de CD de solução estoque de vacina dT, mantida por 5 semanas com MS a 37°C e livre, nas mesmas condições. (B) Elipticidademolar a 222 nm das mesmas soluções.....	3.18
Figura 11. Perfil de eluição dos sobrenadantes das amostras de vacina dT mantidas a 37°C por 5 semanas na presença de MS.....	3.19
Figura 12. Cinética de liberação <i>in vitro</i> de MSdT.....	3.21
Figura 13. Perfis de eluição por HPLC dos sobrenadantes das amostras de MSdT mantidas a 37°C por 120 dias.....	3.23
Figura 14. Elipticidade molar a 222 nm em função do pH para TTxd, DTxd e	3.24

vacina dT

Figura 15. Relação de fluorescência a 350 nm e a 330 nm para TTxd, DTxd e vacina dT.	3.25
Figura 16. Relação de fluorescência a 350 nm e a 330 nm para TTxd e para DTxd.....	3.26
Figura 17. Cinética de formação de IgG total antitetânicos e antidiftéricos em camundongos.....	3.29
Figura 18. Cinética de formação de anticorpos neutralizantes antitetânicos e antidiftéricos em camundongos.....	3.29
Figura 19. Cinética de formação de anticorpos neutralizantes antitetânicos e e antidiftéricos em camundongos.....	3.33
Figura 20. Cinética de formação de IgG ₁ antitetânico e antidiftérico e em camundongos.....	3.34
Figura 21. Cinética de formação de IgG _{2a} antitetânico e antidiftérico em camundongos.....	3.34
Figura 22. Micrografia eletrônica de MSdT lote 3. (A) aumento de 5000H. (B) aumento de 3000H.....	3.36
Figura 23. Cinética de formação de anticorpos anti-DTxd: IgA, IgM, IgG _{2a} e IgG ₁ em camundongos imunizados com vacina MSdT, ou por via nasal, oral e intraperitoneal.....	3.42
Figura 24. Cinética de formação de anticorpos anti-TTxd: IgA, IgM, IgG _{2a} e IgG ₁ em camundongos imunizados com vacina MSdT, ou por via nasal, oral e intraperitoneal.....	3.43
Figura 25. Relação entre os títulos de IgG ₁ e IgG _{2a} antitetânicos e antidiftéricos para animais que receberam a vacina MSdT e controle, por via intra peritoneal, nasal e oral.....	3.44
Figura 26. Cinética de formação de anticorpos antitetânicos e antidiftéricos em cobaias e determinados por ToBI (valores médios de cada grupo). Os animais receberam MSdT e a formulação de MSdT com dT adsorvida em gel de Al(OH) ₃	3.46

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Condições experimentais para o estudo fatorial para o desenho de microesferas com tamanhos definidos.....	2.10
Tabela 2. Esquema de imunização e sangria de camundongos para o ensaio de comparação de MSdT com dT livre.....	2.13
Tabela 3. Esquema de imunização e sangria de camundongos para o ensaio de comparação de MSdT com dT em gel de $Al(OH)_3$	2.13
Tabela 4. Esquema de imunização e sangria de camundongos para o ensaio de comparação do efeito da via de imunização de MSdT com dT livre.....	2.14
Tabela 5: Comparação entre as características obtidas nas microesferas através da variação de três fatores: concentração de PVA, relação de FD:FC e velocidade da segunda emulsão.....	3.2
Tabela 6. Abordagens para a proteção de proteínas encapsuladas em micropartículas de PLGA.....	3.9
Tabela 7. Características das formulações de vacina dT em microesferas (MSdT).....	3.12
Tabela 8. Dosagem de TTxd e de DTxd por ELISA no sobrenadante das microesferas incubadas a 37°C por 6 semanas.....	3.14
Tabela 9. Atividade antigênica das frações tetânica e diftérica após incubação por 5 semanas a 37°C de vacina dT livre e com microesferas brancas (média de 3 experimentos).....	3.18
Tabela 10. Título de anticorpos ao 42º dia (fração tetânica) e ao 28º dia (fração diftérica) nos grupos experimentais.....	3.47
Tabela 11. Cinética de liberação <i>in vitro</i> das anatoxinas encapsuladas.....	5.1
Tabela 12. Efeito dos produtos da degradação da matriz polimérica sobre a estabilidade das proteínas encapsuladas.....	5.1
Tabela 13. Cinética de liberação <i>in vitro</i> das anatoxinas encapsuladas – ensaio cumulativo. (A) MSdT.....	5.1

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Células apresentadoras de antígeno
BSA	Albumina de soro bovino
CD	Dicroísmo circular
CTL	Linfócito T citotóxico
dT	Vacina dupla de uso adulto (contra difteria e tétano)
DT	Vacina dupla de uso infantil (contra difteria e tétano)
DTP	Vacina tríplice bacteriana (contra difteria, tétano e coqueluche)
DTxd	Anatoxina diftérica
FC	Fase contínua
FD	Fase dispersa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
Lf	Limite de floculação
LPS	Lipopolissacarídeo
MS	Microesferas de PLGA
MSdT	Vacina dT em microesferas de PLGA
PLGA	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
PVA	Álcool poli vinílico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
TTxd	Anatoxina tetânica

RESUMO

Esta tese envolveu o estudo de encapsulação de vacina bivalente contra difteria e tétano de uso adulto (dT) em microesferas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), com o objetivo de desenvolver uma formulação que induzisse uma resposta protetora com um número reduzido de doses, ou preferencialmente de apenas uma dose. Para ter sucesso, uma formulação como tal deve ter um perfil de liberação de antígeno que simule as múltiplas doses que recebem o indivíduo. Assim, nesta tese são mostrados os resultados dos experimentos de caracterização bioquímica e imunológica da formulação citada, sem o uso de estabilizadores protéicos, a fim de reduzir a complexidade do sistema em estudo. Do ponto de vista das proteínas encapsuladas, tal caracterização envolveu estudos de fluorescência, de dicroísmo circular, de atividade antigênica e determinação por HPLC da degradação durante o processo de encapsulação. Do ponto de vista da formulação, foram realizados ensaios de degradação *in vitro* e de atividade imunogênica *in vivo*, em camundongos e cobaias.

Os dados obtidos indicaram que a encapsulação em microesferas de PLGA de vacina dT, sem o uso de estabilizadores, permitiu a produção de uma formulação vacinal viável, capaz de estimular uma resposta imunológica protetora e de memória, abrindo caminho para o desenvolvimento da tecnologia de produção de vacinas polivalentes encapsuladas em microesferas de PLGA.

ABSTRACT

The study on encapsulating a bivalent single dose vaccine against diphtheria and tetanus for adults (dT) within PLGA microspheres is described in this thesis. A successful single dose vaccine must show an antigen release profile mimicking the several doses a person should receive during the life. Therefore, results from the immunological and biochemical characterization of the formulation, prepared without protein stabilizers, is showed here. From the encapsulated protein point of view the characterization involved fluorescence, circular dichroism, antigenicity and HPLC analysis. From the formulation point of view, there were performed in vitro release assays and immunogenicity on mice and on guinea-pigs.

The results indicated that the dT microencapsulation within PLGA microspheres without protein stabilizers lead to the production of a viable vaccine formulation, able to elicit protective and memory immune response.

1. INTRODUÇÃO

No início do século XXI, doenças infecciosas continuam a ser a maior causa de mortalidade e de morbidade nas populações humanas, particularmente em países em desenvolvimento. Além disso, o próprio ser humano, pelo crescimento desordenado, tem levado à destruição os ecossistemas extremamente delicados do planeta, favorecendo o advento de novas doenças. Deixando de lado a questão ambiental, a estratégia mais eficiente dos pontos de vista econômico e epidemiológico para enfrentar esse desafio é o desenvolvimento de vacinas baratas, eficientes e com uso extensivo.

Em geral, as vacinas mais eficientes são preparações relativamente impuras de microorganismos mortos e misturas de seus componentes, ou formas vivas e atenuadas do patógeno. Devido aos efeitos adversos, por vezes graves, decorrentes do uso daquelas de composição pouco definida, há um estímulo para a busca de vacinas mais seguras baseadas em subunidades purificadas. Este incremento na qualidade, entretanto quase sempre ocorre em detrimento da imunogenicidade, obrigando a adição de substâncias que aumentem a resposta imunológica e não apresentem efeitos tóxicos em humanos (Jones *et al.*, 1996).

Adjuvantes são definidos como quaisquer substâncias que, incorporadas à formulação de uma vacina, atuam para acelerar, prolongar, ou, ainda aumentar a qualidade e a especificidade da resposta imunológica a um determinado antígeno (Edelman, 2002). São tidos como os componentes mais críticos no desenvolvimento de uma formulação vacinal (Cox & Coulter, 1997) e, conseqüentemente, as pesquisas por novos adjuvantes têm tido um impulso grande tanto no meio acadêmico quanto no industrial. Nos últimos 5 anos houve a publicação de mais de 2000 artigos científicos em revistas especializadas abordando o assunto (PubMed, 2005) e o depósito de mais de 20 patentes apenas nos EUA nos últimos 10 anos (USPTO, 2005) (figura 1).

No Instituto Butantan, o Laboratório de Microesferas Lipossomas, coordenado pela Dra Maria Helena Bueno da Costa vem, há dez anos,

pesquisando adjuvantes particulados seja com antígenos produzidos no próprio Instituto, seja por outros, com o intuito de desenvolver formulações vacinais estáveis, eficientes e seguras (Costa *et al.*, 2002; Costa & Fattal, 2000; Quintilio *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 1997).

Figura 1. Número de artigos publicados em revistas internacionais sobre adjuvantes para vacinas nos últimos 20 anos (A); Número de patentes requeridas no escritório nacional de patentes dos EUA desde 1977 (B).

Dentro deste contexto, a presente tese envolveu o estudo de uma formulação de vacina bivalente contra difteria e tétano em microesferas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA). Foram avaliadas questões referentes à estabilidade dos antígenos e à atividade imunogênica da formulação em animais de laboratório.

A fim de uma melhor compreensão dos conceitos envolvidos neste trabalho, são feitas, nos próximos tópicos, algumas considerações sobre adjuvantes, microesferas biodegradáveis e vacinação contra difteria e tétano.

Adjuvantes

O uso de adjuvantes foi descrito pela primeira vez na década de 1920 (Edelman, 2000), quando Ramon mostrou que a adição de substâncias de natureza tão heterogêneas quanto miolo de pão, ágar, óleo de milho, fécula de mandioca, lecitina ou saponina eram capazes de estimular uma resposta

imunológica contra difteria e tétano. No caso específico das vacinas, as vantagens potenciais no uso de adjuvantes nas formulações incluem o aumento da imunogenicidade de imunógenos fracos, a redução da quantidade de imunógeno e do número de inoculações necessárias para conferir a proteção adequada, além do aumento da eficácia das vacinas utilizadas em recém-nascidos, idosos ou em indivíduos imunologicamente comprometidos (Goodman, 1995). A era atual na pesquisa de adjuvantes começou há cerca de 30 anos com a identificação do muramil dipeptídeo e do lipídeo A como os componentes mais ativos de bactérias Gram positivas e Gram negativas, respectivamente.

Exemplos clássicos de adjuvantes são emulsões oleosas, saponinas, sais de alumínio e de cálcio, surfactantes não-iônicos, derivados de lipopolissacarídeos (LPS), frações de micobactérias, nano e micropartículas, citocinas, toxinas bacterianas e polissacarídeos derivatizados (Cox & Coulter, 1997). Os mecanismos celulares e moleculares *in vivo* necessários para a geração de uma resposta imunológica efetiva, dependente criticamente da co-injeção de adjuvante são pouco compreendidos. Desse modo, os requerimentos moleculares dos adjuvantes são desconhecidos (Schijns, 2000). Propõe-se (Cox & Coulter, 1997; Singh & O'Hagan, 1999) que eles possam agir em pelo menos um de cinco modos:

1. Imunomodulação: é a capacidade do adjuvante de alterar a rede de citocinas. Uma boa modulação significa uma resposta mais rápida e eficiente, com uma quantidade menor de imunógeno, além do direcionamento para T_H1 ou T_H2 ;

2. Apresentação: é a habilidade de um adjuvante em manter a conformação nativa do imunógeno para a apresentação às células imunocompetentes. Uma boa apresentação leva a um aumento no teor de anticorpos neutralizantes, além de garantir uma resposta mais duradoura.

3. Indução de resposta citotóxica (CTL): é a capacidade do adjuvante de estimular uma resposta CTL pela liberação do imunógeno em quantidade suficiente no citossol de uma célula apresentadora de antígenos (APC) para permitir o processamento via MHC classe I.

4. Direcionamento: é a capacidade de o adjuvante liberar o imunógeno eficiente e seletivamente para as células do sistema imunológico.

5. Depósito: é a capacidade de um adjuvante em reter o imunógeno no local de inoculação. O depósito aumenta a eficiência da liberação do imunógeno para as APC.

Para o adjuvante ser efetivo, ele nem sempre precisa estar química ou fisicamente associado ao imunógeno. Aqueles que atuam por efeito imunomodulatório são eficientes mesmo quando administrados em local ou em um momento diferente daquele da inoculação do imunógeno (Cox & Coulter, 1997). As outras quatro formas de atuação dos adjuvantes dependem da associação imunógeno-adjuvante. Por associação, entendem-se interações físicas ou químicas que envolvam desde uma ligação covalente direta até uma simples co-microencapsulação. Um exemplo desta última é a indução de uma resposta imunológica contra um epitopo B com a co-encapsulação de uma proteína carregadora em lipossomas (Gregoriadis *et al.*, 1993).

Quanto aos sais de alumínio, AlPO_4 e $\text{Al}(\text{OH})_3$, os únicos adjuvantes aprovados para uso humano (White & Hem, 2000), o principal mecanismo de ação é a formação de depósito, levando a uma liberação lenta do antígeno e prolongando a exposição entre o antígeno, as APCs e os linfócitos (Gupta *et al.*, 1993). Estes sais são imunomodulatórios e induzem uma resposta $\text{T}_\text{H}2$ muito forte, caracterizada por um alto nível de anticorpos, não fixadores de complemento e uma resposta imune celular muito baixa (Cox & Coulter, 1997). Esta atividade imunomodulatória depende de vários fatores, sendo mais importantes, o grau de adsorção do antígeno e a dose do adjuvante (Gupta & Siber, 1995). A OMS recomenda para as anatoxinas tetânica e diftérica, uma adsorção mínima de 80 % para garantir a eficácia da formulação.

Embora bastante eficientes os adjuvantes de alumínio têm algumas limitações, dentre as quais: instabilidade no congelamento, possibilidade de indução de IgE específico, incapacidade de induzir uma resposta de mucosa (Cox & Coulter, 1997) e de induzir uma resposta citotóxica (Jiang *et al.*, 2005), ao lado da natureza da resposta imunológica induzida ($\text{T}_\text{H}2$ forte), que pode ser desejável ou não, dependendo da aplicação.

Em termos práticos, essas deficiências são pouco importantes, sendo razoável pensar que qualquer nova formulação deve mostrar-se superior em termos de segurança e de efeito adjuvante.

Há, no entanto a questão do **número de doses** das vacinas com gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$. O calendário vacinal adotado no estado de São Paulo, por exemplo, recomenda um total de 10 antígenos e 16 doses em crianças com menos de 16 meses. Um número grande de doses significa além de um custo maior para o sistema público de saúde, maior probabilidade de falha no esquema vacinal e a não indução de uma resposta imunológica adequada nos indivíduos.

Desse modo, os esforços se direcionam para o desenvolvimento de adjuvantes capazes de estimular uma resposta imunológica duradoura. Neste aspecto, têm tido um destaque especial as micropartículas biodegradáveis.

Micropartículas biodegradáveis

Em 1979, um trabalho publicado por Preis e Langer mostrou o uso de poli(etileno-co-cloreto de vinila), um polímero não biodegradável, como adjuvante na indução uma resposta imunológica contra albumina bovina, gama-globulina e ribonuclease. Iniciava-se a era de utilização de polímeros para uso em aplicações de liberação controlada de antígenos. Há três classes gerais desses polímeros: polianidridos, poliorto-ésteres e polésteres (Edelman & Langer, 1993; Heller, 1993). Apesar de cada um deles apresentar vantagens específicas, somente os polésteres de ácido láctico e glicólico foram aprovados para uso em humanos (Cleland, 1995), inicialmente em suturas e próteses ortopédicas e, posteriormente em sistemas de liberação controlada de drogas. Uma formulação de agonista de hormônio luteinizante em microesferas de PLGA foi aprovada pelo FDA para uso no tratamento de câncer de próstata, endometriose e puberdade precoce em crianças (Furr & Hutchinson, 1992).

Há cerca de uma década, uma série de trabalhos têm demonstrado o potencial das partículas de PLGA como **adjuvante para vacinas**, embora o efeito das microesferas no sistema imunológico ainda não esteja totalmente claro. Parece que tal efeito decorre da fagocitose das partículas pelas células dendríticas, macrófagos e nódulos linfáticos locais após uma inoculação

intramuscular, **além da liberação lenta do antígeno, decorrente da degradação lenta da matriz polimérica das microesferas** (Waeckerle-Men & Groettrup, 2005) **e de uma reação inflamatória branda, possivelmente envolvida no estímulo do sistema imunológico** (Jiang *et al.*, 2005).

Vários antígenos vacinais foram encapsulados em microesferas de PLGA: Esparza e Kissel (1992) encapsularam anatoxina tetânica em microesferas de PLGA e mostraram que a formulação obtida foi mais imunogênica do que aquela com gel de hidróxido de alumínio.

Uma mistura de toxina pertussis destoxificada e de hemaglutinina filamentosa de *Bordetella pertussis* foi encapsulada em microesferas de PLGA, induzindo uma resposta celular bastante intensa e proteção em camundongos contra uma infecção nasal de *B. pertussis* (Conway *et al.*, 2001). Shi e colaboradores (2002) avaliaram uma formulação de vacina contra hepatite B de dose única, encapsulando HBsAg em microesferas e com gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$. A mistura de adjuvantes induziu, em camundongos, uma resposta igual ou superior à da formulação apenas com gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$. Como outros exemplos de antígenos já descritos em formulações com microesferas de PLGA, pode-se citar ainda a anatoxina diftérica (Johansen *et al.*, 2000) e a proteína SPF166 de *Plasmodium falciparum* (Rosas *et al.*, 2002).

Além de proteínas, vírus inteiros, como aquele da encefalite japonesa, já foram encapsulados (Yeh *et al.*, 2002) com bons resultados em modelos animais.

Entretanto ainda são muito restritos na literatura estudos de vacinas polivalentes em microesferas de polímeros biodegradáveis.

Vacinação contra difteria e tétano

Difteria e tétano são doenças agudas, freqüentemente fatais, cujas manifestações clínicas decorrem da liberação de toxinas no organismo infectado. Antes de detalhar a composição de tais vacinas, convém dar uma breve introdução das características destas doenças:

Difteria: é uma doença aguda, contagiosa, freqüentemente fatal, causada por uma bactéria Gram-positiva, a *Corynebacterium diphtheriae*. A

bactéria coloniza o trato respiratório e é transmitida de pessoa para pessoa através das secreções nasofaríngeas. Uma vez instalada, a bactéria produz uma exotoxina que se espalha pelo organismo. A toxina, do tipo AB, é uma proteína com peso molecular de 62 kDa. O fragmento B faz a ligação da toxina aos receptores celulares, permitindo a internalização do fragmento A que tem atividade enzimática e acaba por inibir a síntese protéica no interior da célula, levando-a à morte. Apesar de se difundir por todo o organismo, a toxina age mais particularmente no coração (miocárdio) e nos sistemas nervosos central e periférico (induzindo fraqueza e paralisia).

A imunidade contra a difteria é mediada por anticorpos, principalmente IgG e de IgA. A antitoxina circula por todo o organismo e passa facilmente pela barreira placentária levando, assim, a uma imunidade passiva do recém-nascido nos primeiros meses de vida. No organismo, a produção de antitoxina pode ser induzida diretamente pela toxina diftérica liberada pela *C. diphtheriae* no doente, ou ainda pela vacinação com a toxina destoxificada (Galazca, 1993a).

Após aquecimento (35 °C) e tratamento com formol a 0,7% (30 dias), a toxina diftérica se transforma em um derivado atóxico denominado anatoxina¹. Perde sua capacidade de se ligar às células e a sua atividade enzimática, mantendo, porém sua imunogenicidade. **Esta anatoxina é utilizada na vacinação contra a difteria.**

Tétano: sabe-se que os sintomas de tétano estão ligados a uma neurotoxina muito ativa, produzida quando do crescimento do *Clostridium tetani*. Esta bactéria anaeróbica não é invasiva e a infecção bacteriana fica localizada. A doença surge geralmente após a infecção de uma escoriação cutânea por esporos de *C. tetani* que se transformam em bacilos no tecido necrosado, sob uma pressão reduzida de oxigênio.

A toxina produzida pelo bacilo é neurotrópica fixando-se sobre os receptores gangliosídicos das terminações nervosas. Ela se acumula e

¹ A literatura internacional denomina a toxina destoxificada como toxóide (*toxoid* em inglês). No entanto, a Farmacopéia Brasileira adota o termo **anatoxina** para a toxina destoxificada. O termo **toxóide** é restrito à anatoxina adsorvida em gel de Al(OH)₃. Será utilizada nesta tese a denominação da Farmacopéia Brasileira.

bloqueia a liberação, nas sinapses, de neurotransmissores inibidores, como glicina e ácido γ -aminobutírico. Trata-se de uma toxina produzida intracelularmente como uma cadeia polipeptídica simples de 150,5 kDa. Após a lise celular, a toxina é liberada no meio e clivada por proteases endógenas, resultando em dois fragmentos, um de 52,3 kDa (fragmento A) e outro de 98,3 kDa (fragmentos B e C) ligadas por uma ponte dissulfeto (Rappuoli, 1997).

Esquema 1. Estrutura da toxina tetânica. Depois da lise celular, a toxina é liberada para o meio e clivada por proteases endógenas, resultando em duas cadeias ligadas por uma ponte dissulfeto.

A imunidade contra a toxina é mediada por anticorpos neutralizantes. As antitoxinas tetânicas são IgG que, como no caso da difteria, podem passar pela barreira placentária além de serem capazes de neutralizar a toxina em tecidos necrosados infectados (Galazca, 1993b). Semelhantemente à difteria, a toxina tetânica produzida no cultivo do *C. tetani*, destoxificada com calor ou formol e purificada, transforma-se em **anatoxina tetânica**, usada na vacinação.

As vacinas contra difteria e contra tétano foram desenvolvidas na década de 1920 (Ramon, 1924) e seu processo de produção tem sido essencialmente o mesmo no decorrer dessas oito décadas. Além das anatoxinas, a vacina atualmente em uso contém conservante (timerosal) e gel de Al(OH)₃ como adjuvante.

Programas de vacinação contra difteria e tétano estão entre as campanhas mais seguras e mais bem sucedidas contra doenças infecciosas. Ambas as doenças estão bastante diminuídas ou praticamente desapareceram em países onde a imunização apropriada foi realizada. **Os casos que ainda ocorrem são em pessoas que não receberam todas as doses na infância**

ou que não receberam as doses de reforço na idade adulta (Rappuoli, 1997).

No Brasil, segundo dados da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA, 2002), difteria e tétano são consideradas “doenças transmissíveis com tendência de declínio”. Em 2002 foram registrados 19 casos de difteria e 399 casos de tétano, dos quais 33 do tipo neonatal. O controle de ambas, mesmo com o uso de uma vacina eficiente, depende da manutenção de uma ampla cobertura vacinal, obtida pela aplicação de todas as doses preconizadas (FUNASA, 2002). No estado de São Paulo, onde a cobertura vacinal e a rede de acompanhamento é das mais eficientes no país, no ano de 2004 houve 2 casos de difteria, nenhum caso de tétano neonatal e 25 casos de tétano acidental (CVE - São Paulo, 2005).

Para assegurar a cobertura vacinal, que pode ser diminuída seja pela dificuldade logística para distribuir as duas ou três doses necessárias para imunizar a população, seja pelo não retorno do indivíduo para tomar todas as doses necessárias, foi proposto o desenvolvimento de **vacinas de dose única**. A fim de atingir este objetivo, esforços estão sendo centrados no desenvolvimento de formulações de sistemas de liberação controlada em microesferas de PLGA.

2. OBJETIVOS

O estudo de encapsulamento de proteínas em micropartículas de PLGA é um campo profícuo para estudo de estabilidade e de imunogenicidade. Do lado da proteína encapsulada, interações com o polímero ou durante o processo de produção ou de degradação das microesferas podem interferir na estabilidade proteica, reduzindo potencialmente a atividade imunogênica *in vivo*.

Investigações realizadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Microesferas e Lipossomas do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan mostraram a eficiência de uma formulação de uma proteína modelo em microesferas de PLGA no desenvolvimento de uma resposta imunológica em animais (Bueno da Costa *et al.*, 1998; Bueno da Costa & Fattal, 2000). Visto que o Instituto Butantan produz vacinas contra difteria e tétano de uso infantil (quádrupla - DTPH; tríplice bacteriana - DTP; dupla de uso infantil - DT) e de uso adulto (dupla de uso adulto - dT; toxóide tetânico - TT) compostas basicamente do antígeno (anatoxina), conservante (timerosal) e adjuvante (gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$), a proposta deste trabalho é o desenvolvimento de tecnologia para o encapsulamento de uma **vacina dupla, isto é, bivalente, de uso adulto contra difteria e tétano (dT) em microesferas de PLGA**. Inclui-se caracterização físico-química-imunobiológica da formulação, de modo a obter uma resposta imunológica superior àquela obtida com a vacina formulada em gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ efetiva e, principalmente, de longa duração visando o desenvolvimento de uma **vacina de dose única**.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Reagentes (Todos os reagentes eram de grau analítico e foram usados sem purificação prévia):

3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Sigma)

Albumina de soro bovino fração V (BSA) (Calbiochem)

Álcool polivinílico (PVA, PM 49000) Mowiol® (Aldrich)

Anatoxina diftérica concentrada (1800 Lf/mL) (Serviço de Bacteriologia - Instituto Butantan)

Anatoxina tetânica concentrada (1960 Lf/mL) (Serviço de Bacteriologia - Instituto Butantan)

Conjugado anti-IgG de cavalo-peroxidase (Sigma)

Conjugado anti-IgA de camundongo-peroxidase (Sigma)

Conjugado anti-IgG₁ de camundongo-peroxidase (Sigma)

Conjugado anti-IgG_{2a} de camundongo-peroxidase (Sigma)

Conjugado anti-IgG de camundongo-peroxidase (Sigma)

Conjugado anti-IgM de camundongo-peroxidase (Sigma)

Conjugados de soro de cavalo-peroxidase antidiftérico e antitetânico (Laboratório de testes *in vitro* da Seção de Controle Biológico do Serviço de Controle de Qualidade – Instituto Butantan)

Kit para determinação da concentração de lactato (Sigma, 735-10 e 735-11)

Leite desnatado Molico® (Nestlé)

PLGA (poli-láctico-co-glicólico) ou Lactel BP 0100 ® de razão láctico/glicólico 50:50 (PM 45 000 a 75 000) (Sigma)

Ponceau S (Sigma)

Reagente de Folin-Ciocalteus (Merck),

Soros antidiftérico e anti-tetânico desenvolvidos em cavalos (produzidos na Seção de Plasmas Hiperimunes do Instituto Butantan)

Soros antidiftérico e anti-tetânico desenvolvidos em cobaias (produzidos no Serviço de Controle de Qualidade do Instituto Butantan)

Timerosal (Merck)

Tween 20 ou 80 (Sigma)

Vacina dupla de uso adulto sem adjuvante consistindo de uma mistura das anatoxinas tetânica e diftérica produzidas e purificadas no Serviço de Bacteriologia do Instituto Butantan, à concentração de 20 Lf/mL e de 4 Lf/mL, respectivamente diluída em solução fisiológica contendo timerosal a 0,37 mmol/L (Seção de Vacinas Múltiplas do Instituto Butantan);

Equipamentos e materiais auxiliares:

Filtros de poros 0,22 µm e 0,45 µm (Millipore),

Sistema de filtração de solventes para o HPLC (Millipore)

Placas para ELISA NUNC Maxisorb

Placas de fundo em “U” Costar

Sistema de ultrafiltração AMICON®

Espectropolarímetro Jasco J720 – Instituto de Química - USP

Emulsificador Ultraturrax

Agitador Heidolph RZR2051 equipado com taquímetro

Liofilizador Edwards – Laboratório de Bioquímica e Biofísica – Instituto Butantan

Espectrofotômetro Pharmacia Ultraspec 1000

Espectrofotômetro Varian Cary 3E – Instituto de Química - USP

Fluorímetro Hitachi F2000 – Instituto de Química - USP

Equipamento de HPLC Shimadzu equipado com coluna QC-PAK GFC 300 (7,8 mm H 15 cm, 7,2 mL)

Microscópio eletrônico de varredura Leica LEO 400i - UNICAMP

Leitor de placas ELISA Titertek Multiskan MCC/340.

Métodos

Métodos analíticos

1. Dosagem de proteína pelo método de Lowry (micrométodo) (Peterson, 1977)

Reagente A: solução aquosa contendo 0,25 mol/L de NaOH, 0,025% (p/v) de sulfato de cobre(II), 0,05% (p/v) de tartarato de sódio e potássio e 2,5% (p/v) de Na_2CO_3 .

Reagente B: solução do reagente de Folin-Ciocalteu a 0,4 mol/L.

A cada 100 μL de amostra adicionaram-se 100 μL do reagente A. Depois de 10 min, à temperatura ambiente, adicionaram-se 50 μL do reagente B, misturando bem. A leitura da absorbância foi feita 30 min depois, a 690 nm automaticamente em leitor de ELISA. Para todas as determinações montou-se uma curva padrão de BSA em PBS de 1 a 10 $\mu\text{g/mL}$.

2. Espectroscopia no ultravioleta

Foram realizados espectros de amostras de vacina dT em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, varrendo-se o espectro entre 200 nm e 400 nm. Estes espectros foram realizados contra branco contendo 0,37 mmol/L de timerosal em PBS.

3. Cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC

Alíquotas de 20 μL de amostra foram injetadas automaticamente em coluna QC-PAK GFC 300 previamente equilibrada com PBS através de sistema de HPLC SHIMADZU®. As eluições foram realizadas mantendo-se fluxo de 0,6 ou de 0,8 mL/minuto, temperatura da coluna de 20° C e tempo de corrida 20 minutos.

4. Dicroísmo circular (CD)

Foram realizados espectros de CD em um espectropolarímetro JASCO J 720, usando cubetas de 0,1 cm de caminho óptico. Foram feitas varreduras de 190 nm a 320 nm.

5. Medidas de fluorescência

Os espectros de fluorescência foram realizados em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. O comprimento de onda de excitação foi de 280 nm e o perfil de emissão foi registrado de 220 a 400 nm, contra um branco de PBS contendo ou não timerosal na mesma concentração da vacina dT.

6. ELISA de captura - ELISA Lf (modificado de Xing *et al.*, 1996)

Resumidamente, fez-se a sensibilização (100 µg de proteína por cavidade, 18 h, 4 a 8 °C) de uma placa para ELISA com anticorpos anti-DTxd ou anti-TTxd, desenvolvidos em cobaias. Em seguida, fez-se o bloqueio com leite desnatado (Molico®, 1% em PBS, 1 h, 37° C) e adicionou-se o sobrenadante das microesferas contendo a proteína liberada e a anatoxina de concentração conhecida em Lf/mL (item 7), como curva padrão (1 h, 37° C). Seguiram-se novo bloqueio (Molico®, 2,5% em PBS, 1 h, 37° C), incubação com soro padrão de cavalo – anti-TTxd ou anti-DTxd – (1 h, 37° C) e de um conjugado anti-IgG de cavalo - peroxidase (1 h, 37° C). Alternativamente substituiu-se as etapas de soro de cavalo e conjugado por uma única incubação com soro de cavalo conjugado com peroxidase (1 h, 37° C). Seguiu-se a adição de substrato – TMB 0,416 mmol/L em tampão acetato 22 mmol/L pH 5 contendo 2,9 µmol/L de H₂O₂ – (20 a 30 min, temperatura ambiente). Interrompeu-se a reação com ácido sulfúrico 1 mol/L e fez-se a leitura das absorbâncias a 450 nm em leitor automático de ELISA.

7. Determinação do limite de floculação - Lf (Farmacopéia Brasileira, 2001)

A determinação do limite de floculação da vacina concentrada (item 12) foi realizada na Seção de Controle Físico-Químico do Serviço de

Controle de Qualidade do Instituto Butantan, conforme procedimento recomendado pela Farmacopéia Brasileira. De modo resumido, distribuíram-se em tubos de ensaio volumes variáveis de toxina tetânica padronizada (100 Lf/mL). Adicionou-se em cada tubo um volume constante de 1 mL da amostra. Após homogenização colocou-se em banho-maria a 45 °C. Observou-se constantemente e anotou-se o primeiro tubo que apresentou a reação de floculação. A determinação da concentração em Lf/mL da amostra deu-se multiplicando o volume de toxina de referência adicionada ao tubo pela sua concentração em Lf/mL.

8. Dosagem de lactato

A dosagem de lactato foi realizada com kit comercial (SIGMA, 735-10 e 735-11). Resumidamente, os sobrenadantes (100 µL) foram colocados em placas para ELISA, juntamente com a curva padrão do kit. Em seguida, adicionaram-se 100 µL do reagente. Após incubação a 37 °C, fez-se a leitura das absorbâncias a 550 nm em leitor de ELISA.

9. Microscopia eletrônica de varredura

Pequenas quantidades de microesferas foram colocadas sobre uma fita adesiva de dupla face, de forma que se obtivesse uma superfície plana. Essa camada de amostra foi submetida à metalização com ouro por 10 minutos a vácuo. Realizaram-se, em seguida, as microscopias eletrônicas de varredura utilizando voltagem de aceleração de 6 kV. O tamanho médio das partículas foi determinado por meio do programa de computador Image Tool software (version 3.0, University of Texas, USA).

10. Dosagem de Ponceau S

Prepararam-se soluções de concentrações conhecidas de Ponceau S de 1 a 10 µg/mL em água e determinaram-se as absorbâncias em leitor de ELISA a 492 nm. Construiu-se então uma curva padrão.

11. ToBI (*Toxin Binding Inhibition assay*) (Souza-Matos *et al.*, 2002; Marcovistz *et al.*, 2002)

O ensaio constituiu-se de duas etapas, soroneutralização e ELISA:

A. Soroneutralização - Bloqueia-se uma placa de 96 poços de fundo redondo com 200 μ L de BSA 0,1% em PBS (60 min, 37°C). Após lavagem, prepara-se uma diluição seriada fator 2 dos soros das cobaias e do soro de referência nacional (de concentração conhecida, em UI/mL) em PBS e se adiciona a anatoxina tetânica ou diftérica a 0,1 Lf/mL em todas as cavidades, exceto no controle negativo. Mantém-se uma fileira inteira como controle positivo. Seguem-se incubação (60 min, 37 °C) e acondicionamento em geladeira por 18 h, até a etapa B. Paralelamente, uma placa para ELISA (fundo chato) foi sensibilizada com soro de cavalo antidiftérico ou anti-tetânico diluído a 1 UI/mL em tampão carbonato pH 9,6, também mantida em geladeira até a etapa B.

B. Elisa - A placa para ELISA foi lavada e bloqueada com BSA 0,1% em PBS (60 min, 37°C). Em seguida procedeu-se a transferência de 100 μ L da mistura de soro diluído com anatoxina da placa de fundo redondo e incubou-se (90 min, 37°C). Após lavagem, adicionou-se o conjugado de soro de cavalo anti-diftérico ou anti-tetânico peroxidase diluído em PBS com Tween 80 e BSA 0,1% (2 h temperatura ambiente). Após lavagem, adicionaram-se 100 μ L de substrato – TMB 0,416 mmol/L em tampão acetato 22 mmol/L pH 5 contendo 2,9 μ mol/L de H₂O₂ – (15 a 20 min, temperatura ambiente). Interrompeu-se a reação com ácido sulfúrico 1 mol/L e fez-se a leitura das absorbâncias a 450 nm em leitor automático de ELISA. As lavagens entre as etapas foram realizadas com PBS contendo Tween 80 a 0,05%.

A determinação dos títulos em UI/mL deu-se por comparação da diluição a 50% (diluição em que a absorbância atinge 50% daquela obtida para o controle positivo) da amostra com aquela do soro de referência.

12. ELISA de soros de camundongos

A concentração de anticorpos anti-DTxd e antiTTxd nos soros de camundongos foi determinada por ELISA. As placas foram sensibilizadas com

anatoxina tetânica ou diftérica a 1,0 Lf/cavidade (alíquotas de 100 µL) em tampão carbonato de sódio pH 9,6 (16 h, 2 a 8 °C) e bloqueadas com solução de albumina de soro bovina (BSA) a 0,1% em PBS (60 min, 37°C). Seguiram-se uma incubação com os soros dos camundongos, diluídos em PBS com fator 2 (60 min, 37°C) e a adição de conjugado anti-IgG de camundongo-peroxidase (item 22.1) ou anti-IgG₁ de camundongo-peroxidase, anti-IgG_{2a} de camundongo-peroxidase, anti-IgA de camundongo-peroxidase ou ainda anti-IgM de camundongo-peroxidase (item 22.2). Fez-se nova incubação por 60 min a 37°C, e adicionaram-se 100 µL de substrato – TMB 0,416 mmol/L em tampão acetato 22 mmol/L pH 5 contendo 2,9 µmol/L de H₂O₂ – (20 a 30 min, temperatura ambiente). Interrompeu-se a reação com ácido sulfúrico 1 mol/L e fez-se a leitura das absorbâncias a 450 nm em leitor automático de ELISA. As lavagens entre as etapas foram realizadas com PBS contendo Tween 20 ou 80 a 0,05%. O título de anticorpos foi definido como o logaritmo da diluição na base 2 em que ocorre 20% da saturação.

Métodos preparativos

13. Ultraconcentração de proteína na vacina dT pré-formulada.

A vacina dT, composta por uma mistura de TTxd e de DTxd, é preparada com 20 Lf/mL e 4 Lf/mL, respectivamente. Utilizou-se concentrador AMICON com membrana de polissulfona de 3 kDa de corte.

14. Estabilidade das anatoxinas em função do pH

14.1. Influência do tempo de permanência da proteína em pH ácido

Soluções de Ttxd e de Dtxd foram preparadas a 20 Lf/mL (4,75 mg/mL de proteína) e a 4 Lf/mL (0,96 mg/mL de proteína) respectivamente, bem como soluções de vacina dT, em tampão acetato 40 mmol/mL em quatro pHs diferentes (4,0; 5,0; 6,0 e 7,0), contendo timerosal a 0,37 mmol/L. As amostras foram mantidas a 37° C por duas semanas. Após este período, tanto as amostras quanto os respectivos controles (soluções idênticas preparadas imediatamente antes das análises) foram submetidas a

análise por dicroísmo circular (item 4), por fluorescência (item 5) e por HPLC (item 3).

14.2. Influência do pH na conformação estrutural das anatoxinas

Soluções de Dtxd e de Ttxd foram preparadas a 20 Lf/mL cada (4,81 mg/mL de proteína e 4,75 mg/mL de proteína, respectivamente) em tampão fosfato 100 mmol/L em oito pHs diferentes (2,5 a 9,5, com incremento de 1). Todas as soluções, para evitar interferência, foram preparadas sem timerosal. As amostras foram, então submetidas à análises por fluorescência (item 5) e por HPLC (item 3).

15. Liofilização

As amostras foram liofilizadas em liofilizador Edwards no Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan. Foi adotado ciclo de 24 h a -40 °C, para todas as amostras.

16. Preparo de microesferas de PLGA.

De modo geral, utilizou-se o protocolo já determinado para o preparo de microesferas de PLGA (Namur *et al.*, 1994). Resumidamente, preparou-se uma emulsão primária (W_1/O) de PBS (250 μ L) com 400 mg de PLGA em 4 mL de CH_2Cl_2 , utilizando emulsificador Ultraturrax® a 24 000 rpm durante 2 minutos. A W_1/O foi adicionada sob forte agitação (13 500 rpm) a 20 mL de uma solução de PVA a 2% (p/v). Manteve-se a agitação por 2 minutos. Em seguida, agitou-se suavemente (1000 rpm em agitador Heidolph) a emulsão obtida ($(W_1/O)/W_2$) por 3 horas à temperatura ambiente a fim de evaporar o diclorometano e formar as microesferas, que, em seguida, foram separadas por centrifugação (2000 g, 10 min), lavadas com água, ressuspensas com 2 mL de uma solução de PVA 0,1% (p/v), liofilizadas e armazenadas a -20 °C.

A avaliação da eficiência de encapsulação foi feita pela dosagem do material encapsulado (proteína ou Ponceau S) – itens 17 e 18 – e pela capacidade de encapsulação (Ce):

$$Ce = 100 \cdot H \cdot ([\text{solute adicionado}] - [\text{solute encapsulado}]) / \text{mg}_{\text{PLGA}}$$

17. Estudo fatorial para o desenho de partículas com tamanhos definidos

Montou-se um modelo experimental para analisar o efeito que os parâmetros controláveis do processo poderiam no tamanho das partículas. Este experimento foi realizado com a colaboração de Jocimara A. Namur, do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan e de Elaine Cristina de Magalhães Cabral da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

Os fatores investigados foram três variáveis de processo: velocidade de agitação da segunda emulsão (V), a concentração de PVA na fase contínua e a relação de volumes entre as fases descontínua e contínua (FD:FC). A variável resposta foi o diâmetro médio das microesferas (d). Para a concentração de PVA, o nível inferior (-1) e o nível superior (+1) foram 0,5% (m/v) e 3,5% (m/v), respectivamente e o ponto central (0) foi 2%. As relações FD:FC foram 1:5 (-1) e 1:20 (+1) com ponto central de 1:12,5 (0). A velocidade de agitação da primeira emulsão foi fixada em 24000 rpm. As velocidades de agitação para a segunda emulsão foram 13000 rpm (-1) e 19000 rpm (+1), com ponto central de 16000 rpm (0). A velocidade de agitação na etapa de evaporação do solvente foi fixada em 1000 rpm. Um resumo de todos os parâmetros experimentais está na tabela 1.

No ponto central, as preparações foram realizadas em triplicata. Para avaliar os efeitos e as interações de cara parâmetro realizou-se uma análise estatística com o programa STATISTICA® (Statsoft, Tulsa, OK).

As microesferas foram produzidas como o descrito anteriormente (item 16), sendo que o PBS continha Ponceau S a 1,34 µmol/L.

Tabela 1. Condições experimentais para o estudo fatorial para o desenho de microesferas com tamanhos definidos.

Ponto experimental	PVA		Fases dispersa e contínua		Segunda emulsão	
	Nível	Concentração (%)	Nível	Relação FD:FC	Nível	Velocidade de agitação
1	-1	5	-1	1:5	-1	13000
2	1	35	-1	1:5	-1	13000
3	-1	5	1	1:20	-1	13000
4	1	35	1	1:20	-1	13000
5	-1	5	-1	1:5	1	19000
6	1	35	-1	1:5	1	19000
7	-1	5	1	1:20	1	19000
8	1	35	1	1:20	1	19000
9	0	2	0	1:12,5	0	16000
10	0	2	0	1:12,5	0	16000
11	0	2	0	1:12,5	0	16000

18. Preparo de microesferas contendo vacina dT

Para o preparo de microesferas contendo vacina dT, utilizou-se o procedimento anteriormente descrito (item 16) substituindo o PBS na primeira emulsão pela solução concentrada de vacina dT (item 13).

Uma formulação para uso no experimento com cobaias (item 22.3) foi preparada misturando a vacina encapsulada (MSdT) com uma vacina dT adsorvida em gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ e diluída em 1:4.

19. Determinação da concentração de proteína encapsulada

A quantidade de proteína encapsulada ("protein-loading") foi determinada pela dissolução das microesferas de PLGA liofilizadas (10 mg) com 2 mL de NaOH 0,1 mol/L contendo 2 % de dodecil-sulfato de sódio (SDS) (Xing *et al.*, 1996). A solução obtida teve seu teor em proteínas determinado pelo método de Lowry (item 1).

20. Determinação da antigenicidade das proteínas encapsuladas (modificado de Xing *et al.*, 1996)

Para cada 10 mg de microesferas secas, adicionou-se 1 mL de clorofórmio seguiu-se extração com 1 mL de PBS. Após separação da fase aquosa por centrifugação rápida (13000 rpm), a antigenicidade foi determinada

por ELISA de captura (item 6) na fase aquosa.

21. Cinética de liberação *in vitro* das anatoxinas encapsuladas

Utilizando preparações de microesferas de PLGA contendo vacina dT (MSdT) (0,766 Lf/mgPLGA e 0,146 Lf/mgPLGA, respectivamente) e microesferas brancas, isto é, sem proteína (MS), realizou-se incubação por 6 semanas a 37 °C em PBS com timerosal (10 mg de MS ou de MSdT/ 2 mL de PBS). A cada semana um frasco foi retirado e guardado em freezer (-20°C) até realização dos testes de caracterização (ELISA-Lf, dosagem de lactato, pH).

Para realizar os testes de caracterização da cinética de liberação *in vitro*, as suspensões de microesferas foram descongeladas e centrifugadas (2000 g, 10 min) e os sobrenadantes foram analisados em termos de pH (medido diretamente com fita indicadora), concentração de lactato e atividade antigênica de TTxd e DTxd em Lf/mL.

21.1 Efeito dos produtos de degradação da matriz polimérica sobre a estabilidade das proteínas encapsuladas

Incubaram-se MS brancas com solução de dT (20 Lf/mL de TTxd e 4Lf/mL de DTxd), na proporção de 5 mg de microesferas/mL de vacina em PBS contendo timerosal (0,37 mmol/L), em banho a 37 °C sob agitação suave. Uma vez por semana, num total de cinco semanas, um frasco foi retirado e guardado em freezer (-20°C) até a realização dos ensaios de caracterização. Paralelamente, fez-se um controle com a vacina livre, mantida nas mesmas condições. Para a realização dos testes, as suspensões foram descongeladas e centrifugadas (2000 g/10 min) e os sobrenadantes analisados em termos de pH, ELISA-Lf, CD e por HPLC.

21.2 Cinética de liberação *in vitro* das anatoxinas encapsuladas - ensaio cumulativo

Utilizando uma preparação de microesferas de PLGA contendo TTxd e DTxd (7,79 Lf/10mg_{PLGA} e 3,53 Lf/10mg_{PLGA}, respectivamente; 1,68 µg_{Proteína}/mg_{PLGA}) (MSdT), realizou-se incubação por 120 dias a 37 °C em PBS

com timerosal ($37 \mu\text{mol/L}$) (50 mg de MSdT/ 10 mL de PBS). Semanalmente, a suspensão era centrifugada e o sobrenadante separado e congelado (-20°C) até realização dos testes de caracterização (ELISA, dosagem de lactato, pH e HPLC) e as microesferas no precipitado eram ressuspensas com PBS recém-preparado.

22. Indução da formação de anticorpos anti-DTxd e anti-TTxd em animais

Em todos os experimentos *in vivo*, durante o período de teste, além da determinação de anticorpos, como será descrito adiante, os animais foram observados em termos de peso e aspecto geral da pelagem, para se avaliarem eventuais efeitos tóxicos das vacinas.

22.1 Comparação da MSdT com a vacina livre

Para se avaliar o padrão da resposta e a capacidade de indução de resposta imunológica anti-TTxd e anti-DTxd da formulação contendo a vacina dT encapsulada em microesferas de PLGA, realizaram-se dois ensaios paralelos em camundongos (com a colaboração do Dr. Osvaldo Augusto Sant'Anna, diretor do Laboratório Especial de Microbiologia do Instituto Butantan). Camundongos BALB/c fêmeas (5 por grupo) de 18 a 20g receberam por via intraperitoneal 2 Lf de TTxd e 0,4 Lf de DTxd em microesferas de PLGA liofilizadas e ressuspensas em PBS. Os animais do grupo controle receberam vacina dT livre na mesma concentração daquela na vacina encapsulada. Após a primeira sangria, os animais receberam a mesma dose de vacina dT livre. O esquema de imunização adotado está na tabela 5.

Todas as sangrias foram realizadas pelo plexo venoso retro-orbital e os soros separados foram congelados a -20°C até a titulação. Os títulos de anticorpos contra difteria e contra tétano foram determinados por ToBI (item 11) e por ELISA (item 12).

Materiais e métodos

Tabela 2. Esquema de imunização e sangria de camundongos para o ensaio de comparação de MSdT com dT livre.

	Grupo/dia	
	Resposta próxima	Resposta tardia
1ª dose	0	0
1ª sangria	15	15
Reforço (dT livre)	36	93
2ª sangria	48	106
3ª sangria	113	170

22.2 Comparação da MSdT com a vacina em gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ em camundongos

A vacina encapsulada (MSdT) foi comparada com a vacina dT adsorvida em gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$. Camundongos Balb/C fêmeas (5 por grupo) de 18 a 20g receberam por via intraperitoneal 2 Lf de TTxd e 0,4 Lf de DTxd em microesferas de PLGA liofilizadas em ressuspendidas em PBS. Os animais do grupo controle receberam vacina dT adsorvida em gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ a 0,5 mg/mL na mesma concentração. Após a primeira sangria, os animais receberam como reforço a mesma dose de vacina dT livre. O esquema de imunização adotado foi um pouco diferente daquele descrito no item anterior e está na tabela 6.

Tabela 3. Esquema de imunização e sangria de camundongos para o ensaio de comparação de MSdT com dT em gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$.

	Grupo/dia	
	Resposta próxima	Resposta tardia
1ª dose	0	0
1ª sangria	29	29
Reforço (dT livre)	44	111
2ª sangria	59	---
3ª sangria	132	132

Todas as sangrias foram realizadas pelo plexo venoso retro-orbital e os soros separados foram congelados a -20°C até a titulação. Os títulos de anticorpos contra difteria e contra tétano foram determinados por ToBI (item 11).

22.3 Efeito da via de imunização na resposta induzida por MSdT em

comparação com vacina dT livre

Com o intuito de se avaliar, dessa vez, a intensidade da resposta e a interferência da via de imunização, realizou-se um terceiro experimento. Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas de 18 a 20 g, 5 animais por grupo. O esquema de imunização e sangria está descrito na tabela 4.

Tabela 4 Esquema de imunização e sangria de camundongos para o ensaio de comparação do efeito da via de imunização de MSdT com dT livre.

Esquema da via de imunização de MSd1 com dT+MS								
Via de imunização	Vacina	Volume/animal (µL)	Dose/animal (Lf)	Reforço		Sangrias (dia)		
				dia	Volume/animal (µL)		Dose/animal (Lf)	
Nasal	dT+MS	30	2 (TTxd)	14º	10	0,6 (TTxd)	0, 7, 21, 42	
	Controle							
Oral	dT+MS	100				30		0,03 (DTxd)
	Controle				0,88 (DTxd)			
Intraperitoneal	dT+MS	200				50		0,5 (TTxd)
	Controle							0,22 (DTxd)

Os animais foram sangrados pelo plexo venoso retro-orbital e os soros foram testados por ELISA (item 12) em termos de IgG₁, IgG_{2a}, IgM e IgA anti-DTxd e anti-TTxd.

22.3. Comparação da MSdT com a vacina em gel de Al(OH)₃ em cobaias

Os objetivos deste experimento foram:

1. comparar a atividade imunogênica da vacina MSdT com a vacina tradicional, formulada em gel de Al(OH)₃ em doses subimunizantes;
2. avaliar indução de memória imunológica;
3. avaliar a atividade de uma formulação mista de vacina em microesferas e em gel de Al(OH)₃.

Três grupos de 6 cobaias (*Porcellus cavia*, variedade inglesa albina) fêmeas, de 450 a 550 g receberam por via subcutânea, 0,75 mL contendo as seguintes doses de vacina:

Grupo 1 (MSdT): 0,66 Lf_{TTxd}/dose e 0,3 Lf_{DTxd}/dose

Grupo 2 ($\text{Al}(\text{OH})_3$): 3,75 Lf_{TTxd} /dose e 0,75 Lf_{DTxd} /dose

Grupo 3 ($\text{MSdT}+\text{Al}(\text{OH})_3$): 4,6 Lf_{TTxd} /dose e 0,98 Lf_{DTxd} /dose

Os animais foram sangrados por punção cardíaca 0, 14, 28, 42, 52, 56, 59, 70, 72, 84, 98, 112, 126, 140 e 154 dias após a vacinação. No 112º dia os animais receberam um reforço de 0,1 mL via subcutânea da vacina dT sem adjuvante, isto é, 0,1 Lf_{TTxd} e DTxd /animal. Como controle, um dos grupos recebeu somente a vacina dT em gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ diluída 1:4 em PBS.

Todos os soros foram congelados e posteriormente testados por ToBI (item 11), para determinação da atividade imunogênica das vacinas.

23. Análise estatística

As análises estatísticas de todos os experimentos foram realizadas com auxílio de planilha de cálculo MS Excel® ou com programa Statistica®. A análise de significância foi feita com teste t de Student com significância de 95% ($p<0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeitos dos parâmetros do processo de produção sobre o tamanho das partículas de microesferas de PLGA

A técnica mais usada para o preparo de microesferas de PLGA é a de emulsão dupla [(W₁/O)W₂] com a evaporação do solvente (McGinity & O'Donnel, 1997). Neste método, o PLGA dissolvido em um solvente orgânico (normalmente CH₂Cl₂ ou acetato de etila) é emulsificado em um meio aquoso. A emulsão obtida é novamente emulsionada em uma outra fase aquosa. Esta emulsão dupla é, então, mantida em agitação contínua à temperatura ambiente até a evaporação completa da fase orgânica. Desse modo, o polímero precipita formando as microesferas contendo o soluto da primeira fase aquosa (Esquema 2, página 3.7). Normalmente se adiciona um estabilizante de emulsão à formulação a fim de evitar a coagulação das partículas. Há uma série de estabilizadores já descritos para uso com PLGA: polivinilpirrolidona, alginato, metil-celulose, gelatina, destacando-se o álcool poli-vinílico (PVA) que foi utilizado neste trabalho, como um dos mais usados (Cleland, 1995).

No processo de produção das microesferas, parâmetros podem ser ajustados de modo que se obtivessem microesferas com características específicas, especialmente em termos de tamanho e de taxa de liberação do soluto encapsulado e porosidade.

Antes do preparo das microesferas contendo a vacina dT, realizou-se um estudo sistemático para se determinar as condições de preparo das microesferas. Fez-se um experimento fatorial com 2 níveis e 3 fatores de estudo, ajustando as velocidades de emulsificação e de concentração de PVA e utilizando Ponceau-S como marcador do compartimento aquoso interno, conforme descrito na tabelas 1 e 5.

As partículas de microesferas obtidas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura e apresentaram superfície esférica uniforme com diâmetros variando de 4 a 15 :m (Figura 2 e Tabela 5). As preparações apresentaram capacidade de encapsulação variando de 33,6% a 49,9% com rendimentos de incorporação 55 a 75% (Tabela 5). A relação de massas foi de

$6,24 \times 10^{-4}$ (0,125 mg de Ponceau S/200 mg de PLGA), representando uma relação molar de $7,9 \times 10^{-7}$ ($760,6 \text{ (PM}_{\text{Ponceau S}} \text{ H } 0,125 \text{ mg/} = 60\,000 \text{ (PM}_{\text{PLGA}} \text{ H } 200 \text{ mg})$).

Figura 2. Micrografia eletrônica de varredura das microesferas produzidas no ponto experimental 2 (A): diâmetro médio de 12 µm – ampliação de 4000x; e 7 (B): diâmetro médio de 12,2 µm – ampliação de 1000x.

Tabela 5: Comparação entre as características obtidas nas microesferas através da variação de três fatores: concentração de PVA, relação de FD:FC e velocidade da segunda emulsão.

Ponto	PVA (%)	FD:FC	Vel. de agitação (rpm)	Diâmetro (: m)	Rendimento (%)	Encapsulação (%)	Diâmetro/ Encapsulação
1	0,5	1:5	13000	15	61	38,1	0,39
2	3,5	1:5		12	55	41,9	0,28
3	0,5	1:20		15	66	49,9	0,3
4	3,5	1:20		13	68	40,9	0,32
5	0,5	1:5	19000	10	68	35,5	0,28
6	3,5	1:5		4	60	36,5	0,11
7	0,5	1:20		12	63	44,8	0,27
8	3,5	1:20		6	74	33,6	0,18
9	2	1:12,5	16000	8	72	44,1	0,18
10	2	1:12,5		8	59	49,3	0,16
11	2	1:12,5		8	75	38,1	0,21

O tamanho das microesferas depende de variáveis inerentemente ligadas ao seu processo de produção. A velocidade de agitação da segunda emulsão (V) e a concentração de PVA são fatores com influência significativa sobre o tamanho das microesferas (tabela 5). O diâmetro das partículas tende a diminuir com o

aumento da velocidade de agitação para formar a emulsão dupla. A redução na velocidade de agitação provavelmente provoca um aumento no tamanho das gotículas, resultando em microesferas maiores (Couvreur *et al.*, 1997). No entanto, é menos provável que tamanho dependa do volume da fase contínua, uma vez que a velocidade de agitação é fixa e constante, o tempo de agitação é relativamente curto (dois minutos) e o volume e a forma do tubo em que se prepara a segunda emulsão podem ser ajustados de modo a se obter uma agitação uniforme. Desse modo, não se observou uma correlação entre a relação FD:FC e o diâmetro das partículas.

A superfície de resposta para as variáveis significantes, V e PVA sobre o tamanho das microesferas encontra-se na figura 3. O aumento da concentração de PVA concomitante com o aumento de V levou à formação de microesferas de menor tamanho (4 : m). A menor concentração de PVA usada (0,5%) e a menor V levaram à produção de partículas de maior tamanho (15 : m).

Com auxílio de programa de análise estatística foi determinada a equação da curva empírica na região experimental:

$$D=10,22-2,12[PVA]-2,90[SV]-0,87[PVA]H[SV] \quad (\text{equação 1})$$

Figura 3. Superfície de resposta dos efeitos da concentração de PVA e da velocidade de agitação da segunda emulsão sobre o tamanho das microesferas de PLGA.

Os valores calculados a partir da equação 1 em conjunto com o gráfico de valores calculados versus valores observados (figura 4) mostram a validade do modelo matemático.

Figura 4. Diâmetros calculados a partir da equação (1) em função dos valores de diâmetro observados.

Alguns estudos (Couvreur *et al.*, 1997; Jeffrey *et al.*, 1993; Vandervoort & Ludwig, 2002) mostraram que quando se aumenta a concentração de estabilizadores na fase contínua, há uma redução no tamanho das microesferas. Em altas concentrações de estabilizadores, há uma menor difusão das gotículas na emulsão, evitando a coalescência e resultando em partículas menores. De fato, observando apenas a concentração de PVA na fase contínua, vê-se que quanto maior a sua concentração, menores são as microesferas formadas (tabela 5). Mas, se a concentração de PVA e a velocidade de agitação na segunda emulsão são combinadas este efeito é menos pronunciado. Este tipo de estudo fatorial permite que se obtenham mais informações sobre um sistema do que analisando cada parâmetro um a um.

Sendo o objetivo otimizar a produção de microesferas para encapsular vacinas e, tendo em mente que o tamanho das partículas e a dispersão são características importantes neste tipo de sistema (Peyre *et al.*, 2003; Cleland, 1995), pode-se realizar este tipo de estudo a fim de definir os meios de controlar os tamanhos das microesferas.

Para o preparo das microesferas contendo a vacina dT encapsulada adotou-se o procedimento com parâmetros um pouco diferentes daqueles utilizados no experimento descrito acima. O protocolo utilizado teve parâmetros semelhantes àqueles dos pontos experimentais 1 e 2, mas com concentração de PVA em 2 %. A escolha dos parâmetros se baseou nos critérios facilidade de manipulação e diâmetro médio das partículas (10 a 15 μm). A relação fase dispersa/fase contínua de 1:5 é mais cômoda para manipular, há uma perda menor de material nas paredes dos frascos e, portanto, melhores condições de reprodutibilidade. O diâmetro médio das partículas acima de 12 μm é interessante para o preparo de vacinas (Cleland, 1995), a exemplo de Peyre e colaboradores (2003) que prepararam uma vacina experimental contra difteria e tétano em microesferas com diâmetros de 10 a 80 μm .

Uma vez definido o protocolo de preparo das microesferas, o foco passa a ser a vacina dT, isto é, TTxd e DTxd.

Dificuldade de encapsulação de proteínas, a questão da diluição

Há muito pouco publicado envolvendo vacinas polivalentes em microesferas de PLGA (Peyre *et al.*, 2003). De modo geral, as publicações partem de soluções de antígeno altamente concentradas. Nesta tese, a fim de aproveitar a estrutura da Seção de Vacinas Múltiplas do Instituto Butantan, resolveu-se partir de uma mistura de anatoxinas já pronta para o uso, isto é a 20 Lf/mL para TTxd e a 4Lf/mL DTxd com 0,1 mg/mL de proteínas totais.

No processo de encapsulação de proteína, utilizam-se 250 : L de solução de proteína para 4,25 mL de mistura final. Isto representa uma diluição da solução de proteína em quase 20 vezes. Torna-se necessário, portanto, que a solução de proteína esteja em uma concentração alta o suficiente de modo que, na formulação final da concentração esteja próxima do desejável de 20 Lf/mL para TTxd e 4Lf/mL DTxd. Como a solução de partida era uma mistura de anatoxinas já diluídas foi necessário concentrar a solução. Utilizou-se, para isso, um sistema AMICON® de filtração por membrana.

A concentração de proteína em mg/mL (por Lowry) foi de 0,1 mg/mL de proteína antes e 1,98 mg/mL após a concentração e a atividade antigênica em Lf/mL foi de 420 Lf/mL para a fração tetânica e de 75 Lf/mL para a fração diftérica. Não houve, portanto, perda detectável de atividade no processo de concentração da formulação de dT. Numa segunda preparação, foi obtida uma solução a 2,5 mg/mL de proteína. Ambas as soluções foram usadas no preparo de microesferas (tabela 7).

Encapsulação da vacina - perda de atividade durante o processo de produção de microesferas

Nos últimos 15 anos, vários trabalhos foram publicados mostrando experimentos de encapsulação de proteínas em partículas de PLGA. Ficou bem claro que o maior problema desse tipo de sistema é a degradação protéica e a liberação incompleta dos antígenos encapsulados (van der Weert *et al.*, 2000).

Para uma melhor discussão deste item, no esquema 2 tem-se um resumo das etapas do processo de produção de microesferas de PLGA.

Esquema 2. Processo de produção de microesferas de PLGA.

No processo de encapsulação de proteínas em microesferas de PLGA há algumas etapas críticas especialmente do ponto de vista da estabilidade protéica. Durante a formação da primeira emulsão, o contato da proteína com solventes orgânicos, com o PLGA em solução e forças de cisalhamento são causas possíveis de degradação protéica (Sah, 1999). A instabilidade protéica no processo de formação da emulsão pode ser considerada como consequência do contato da proteína com a interface água/solvente orgânico ao redor das gotículas da emulsão. Devido à flexibilidade conformacional e à anfipaticidade das moléculas de proteína, elas tendem a adsorver na interface. Isto pode não apenas prejudicar a conformação protéica, mas também pode induzir uma série de transformações físico-químicas e a reações de degradação (Sah, 1999), resultando em desenovelamento e agregação. Na última etapa, a de liofilização, a

proteína perde as moléculas de água de hidratação alterando sua conformação, podendo degradar irreversivelmente e formar agregados. Mais adiante, os dados deste trabalho mostrarão os efeitos desses eventos sobre as proteínas em questão.

Por outro lado, a umidade residual é um fator crítico nas formulações com PLGA, pois, além de poderem induzir uma hidrólise prematura da matriz polimérica, interferindo no perfil de liberação da proteína encapsulada, podem provocar uma queda no pH, comprometendo a estabilidade protéica por hidrólise, por alteração irreversível da conformação imunologicamente ativa, ou ainda pela indução de agregação, especialmente das proteínas formalinizadas, pelo mecanismo de agregação mediado por formaldeído (Schwendeman *et al.*, 1995). Apesar de tudo, esses problemas podem ser evitados pelo uso de crioprotetores para manter a conformação e a atividade da proteína e pelo controle rigoroso da umidade residual no processo de liofilização. O uso de aditivos como $Mg(OH)_2$ mostrou-se efetivo para controle do pH no interior das microesferas, evitando a agregação protéica em uma formulação de BSA em microesferas de PLGA (Zhu *et al.*, 2000) e em uma formulação de TTxd (Jaganathan *et al.*, 2005).

Na tentativa de proteger os antígenos da degradação durante a encapsulação ou armazenamento de formulações com matrizes de PLGA, além do $Mg(OH)_2$ citado, foram descritas algumas abordagens na literatura. Muitas foram revisadas (van der Weert *et al.*, 2000) e na tabela 6 há um resumo de algumas delas.

Deve-se notar que, apesar da possibilidade de degradação extensiva das anatoxinas encapsuladas, **optou-se nesta tese por não utilizar nenhum tipo de protetor**. O efeito protetor de açúcares (manitol, trealose e sacarose), por exemplo, é ainda um pouco controverso. Muitos trabalhos mostraram sua eficácia, outros, todavia, não indicaram nenhum efeito protetor sobre as proteínas encapsuladas (Tamber *et al.*, 2005). Assim, como o objetivo deste trabalho foi de desenvolver a tecnologia de encapsulação de anatoxinas em microesferas de PLGA, a inclusão de outros componentes aumentaria demasiadamente a complexidade do sistema dificultando a análise adequada de todos os parâmetros envolvidos.

Tabela 6. Abordagens para a proteção de proteínas encapsuladas em micropartículas de PLGA (modificado de van de Weert *et al.*, 2000).

Etapa	Fator de estresse protéico	Abordagem de estabilização
Preparo (formação da 1ª emulsão)	Interface água/solvente orgânico	Aumento da concentração de antígeno; Adição de outras proteínas “de sacrifício”; Pré-encapsulação do antígeno em um núcleo hidrofílico.
	Contato da proteína com PLGA	Adição de outras proteínas “de sacrifício”; Pré-encapsulação da proteína em um núcleo hidrofílico.
Preparo (formação da 1ª e 2ª emulsões)	Cisalhamento	Adição de surfactantes; Redução do tempo de homogeneização; Evitar sonicação, preferir outro método de homogeneização.
Preparo (Liofilização)	Perda de água de hidratação das proteínas	Adição de crioprotetores;
Estocagem	Umidade residual	Reduzir o teor de solvente residual; Adição de crioprotetores.

Tornou-se, então, necessário um estudo do comportamento das anatoxinas nas microesferas, desde o processo de produção até a liberação das partículas. Isso passa, obviamente, pelo acompanhamento da atividade imunogênica.

A estimativa apurada da concentração do antígeno encapsulado é essencial para o controle de qualidade de vacinas baseadas em microesferas de PLGA. Aqui, estão envolvidas duas questões: atividade antigênica e concentração de proteína total. Em relação à primeira, são necessários métodos sensíveis para a determinação de atividades muito baixas, por vezes da ordem de menos de algumas unidades Lf por mL. Métodos, como a determinação de limite de floculação de Ramon, não são aplicáveis nesses sistemas em que as concentrações de anatoxina são muito baixas e a visualização de uma reação de floculação, muito difícil. Desse modo, foi necessária a aplicação de outro método para a determinação da atividade antigênica seja como controle de produção das microesferas contendo a vacina dT, seja no estudo da liberação *in vitro* de proteína antigenicamente ativa. A partir do trabalho de Xing e colaboradores

(1996), foi feito o desenvolvimento e a padronização de um ensaio tipo ELISA de captura, para a detecção de anatoxinas tetânica e diftérica antigenicamente ativas.

Para os ensaios de atividade imunogênica das anatoxinas tetânica e diftérica no Serviço de Controle de Qualidade do Instituto Butantan utilizam-se cobaias imunizadas com a vacina e que, após alguns dias (28 para difteria e 42 para tétano), são sangradas e o título de anticorpos específicos, determinados por soroneutralização de toxina *in vivo* ou *in vitro* nos soros. Após precipitação com sulfato de amônio estes soros foram agrupados em “pool” e quantificados obtendo-se os soros para difteria e tétano com, respectivamente, 370 mg/mL e 409 mg/mL proteína total e a 2,46 UI/mL e 0,33 UI/mL de anticorpos específicos antidiftéricos e antitetânicos. Este “pool” foi, então, usado como anticorpo de captura das anatoxinas no ELISA.

Com esse conjunto de reagentes padronizou-se o procedimento de ELISA, então batizado de ELISA Lf (item 6 de Materiais e métodos), com sensibilidade e linearidade para uma faixa de concentração de 6×10^{-2} a 10 Lf/mL para TTxd (coeficiente de correlação médio de 0,995) e 3×10^{-2} a 4 Lf/mL para DTxd (coeficiente de correlação médio de 0,989) (Figura 5).

Figura 5. Curvas padrão de ELISA de captura para anatoxinas diftérica (A) e tetânica (B). Pontos médios de oito ensaios.

A literatura sugere o uso de anticorpos monoclonais anti-TTxd para que se obtenha boa sensibilidade no ensaio (Xing *et al.* 1996). Apesar de terem sido utilizados anticorpos de captura policlonais, os resultados foram muito bons, indicando a adequação dos anticorpos policlonais utilizados.

Com relação à concentração de proteína total na formulação, há na literatura uma série de métodos para a extração de proteínas das microesferas. Dentre eles pode-se citar (1) extração com detergente em meio alcalino (SDS + NaOH) (Cahill *et al.*, 1995); (2) dissolução das microesferas com CH₂Cl₂ e extração das proteínas com PBS ou água (Xing *et al.*, 1996); (3) dissolução das microesferas em meio fortemente alcalino (Sah *et al.*, 1994); (4) hidrólise das microesferas em ácido clorídrico 6 mol/L a 60° C/20h (Chang & Gupta, 1996). Em todos os trabalhos, após a dissolução da microesfera, segue-se a determinação de concentração protéica por um método colorimétrico, como Lowry, ácido bicinchonínico (Smith) ou Bradford. A extração de proteínas por métodos quimicamente muito agressivos é um risco, pois elas podem ser hidrolisadas juntamente com o PLGA, sendo, portanto, subestimadas. Além disso, a presença de excipientes e estabilizadores pode interferir na extração das proteínas com solventes orgânicos (Gupta *et al.* 1997), mais um motivo para, nesta tese, optar-se pelo não uso de estabilizadores protéicos.

A extração com detergente em meio alcalino é o método que tem sido mais usado na determinação de proteínas encapsuladas. Utilizou-se, neste trabalho, uma solução de NaOH a 0,1 mol/L contendo SDS a 2%, como método de extração para dosagem de proteína total. Uma vez que este tipo de tratamento químico pode interferir na estabilidade antigênica das anatoxinas, para a determinação da atividade antigênica residual fez-se a dissolução das microesferas com CH₃Cl e extração das proteínas com PBS, método já descrito na literatura (Xing *et al.*, 1996) com bons resultados. Na tabela 7 estão dados obtidos para três preparações de microesferas com vacina dT (MSdT). É interessante notar que não houve variação muito grande no rendimento das preparações, seja em termos de proteína encapsulada, seja em rendimento total do processo.

Entretanto, os valores de atividade antigênica das preparações (tabela 7) estão bastante aquém do esperado. Na preparação 3, por exemplo, para TTxd, o resultado obtido foi 24% do esperado e para DTxd, 54%, apenas. Como, em proteína, o encapsulação para a preparação foi de 85%, a conclusão foi de perda de atividade antigênica no processo de preparo das microesferas, visto que o controle do procedimento de extração, realizado com as anatoxinas livres, não apresentou queda de atividade no tratamento com clorofórmio. Essa perda pode ocorrer com simples alteração conformacional, comprometendo o reconhecimento pelos anticorpos, com agregação, ou ainda com adsorção protéica à superfície das microesferas. Para avaliar a extensão desse tipo de evento, ensaios de liberação *in vitro* são ferramentas importantes.

Tabela 7. Características das formulações de vacina dT em microesferas (MSdT).

Lote de MSdT	Proteína inicial (mg/mL)	Proteína total (: g/mg)*	Massa de MSdT (mg)	Encapsulação (%)**	Rendimento (%)†	Atividade antigênica (Lf/mg _{MSdT})	
						tétano	difteria
1	1,98	1,09	322,7	88	81	0,0215	0,01
2	2,5	1,1	316,0	71	79	0,0766	0,0146
3	2,5	1,36	336,0	85	84	0,0779	0,0353

*Determinado por Lowry, após dissolução das microesferas; **em relação à proteína total; †recuperação em mg microesferas a partir da massa de PLGA utilizada.

Cinética de liberação *in vitro*: interferência da queda do pH e da temperatura

- Análise estrutural das vacinas

Para avaliar a formulação das MS no que se refere à integridade protéica e perfil de degradação do PLGA, foram realizados os ensaios de cinética de liberação *in vitro*. Foram, basicamente, dois experimentos. No primeiro ensaio, com o objetivo de se verificar o perfil de degradação das microesferas e a evolução da atividade antigênicas das anatoxinas no decorrer do tempo do experimento, 5 mg MSdT em 2 mL de PBS foram incubadas a 37°C e, semanalmente, durante 6 semanas, um frasco era retirado e congelado para análise posterior em termos de pH, concentração de proteína e concentração de lactato.

O conjunto dos resultados obtidos para concentração de lactato e pH para as MSdT e para o controle contendo as microesferas brancas estão na figura 6. Observou-se que a degradação das microesferas não ocorreu de forma contínua. No período observado, o perfil de liberação de lactato é aparentemente bifásico, com alteração do padrão em torno da terceira semana de incubação. A sexta semana também não acompanhou a tendência de liberação de lactato esperada pela observação dos demais, o que pode ser interpretado como uma nova alteração do padrão de degradação a partir deste ponto (figura 6). Com relação às proteínas encapsuladas, foi feito o acompanhamento da liberação por ELISA Lf (tabela 8) e por HPLC (figura 8, tabela 11 - anexo). Observou-se, em relação ao DTxd um pico de liberação na primeira semana que caiu abaixo do limite de detecção do teste nas outras semanas. Quanto ao TTxd, há um aumento gradual de liberação até a 3ª semana, seguido de uma queda abaixo do limite de detecção do teste a partir da quinta semana (tabela 8). Comparando os perfis de liberação de lactato para MSdT e para MS brancas, nota-se que a presença de proteína na formulação (MSdT) não alterou ou alterou muito pouco o perfil de liberação de lactato das microesferas.

Figura 6. Cinética de liberação de lactato e de variação de pH em função do tempo: pH da suspensão de MS (■) e de MSdT (◻); concentração de lactato na suspensão de MS (◊) e de MSdT (●).

Tabela 8. Dosagem de TTxd e de DTxd por ELISA no sobrenadante das microesferas incubadas a 37°C por 6 semanas.

	Semana						
	0	1	2	3	4	5	6
DTxd (Lf/mL)	0,0418	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
TTxd (Lf/mL)	0,015	0,092	0,1	0,07	0,07	<0,07	<0,07

Na figura 7 têm-se os perfis de eluição por HPLC típicos para timerosal (Figura 7 A), TTxd (Figura 7 B), DTxd (Figura 7 C) e vacina dT (Figura 7D). Observou-se, com o decorrer do tempo, a alteração no perfil de eluição (figura 8) no período de 8 a 11 min, onde, tipicamente, eluem monômero de DTxd e as suas subunidades A e B. A determinação das áreas relativas, feita por software, está na tabela 11 (anexo). Sobre este fato será feita uma discussão mais adiante.

Figura 7. Perfil de eluição típico por HPLC em coluna QC-PAK GFC 300 (0,6 mL/min). Detecção por medida de absorbância a 280 nm. (A) PBS com timerosal (1); (B) TTxd (2); (C) DTxd (3) dímero, (4) monômero, (5) subunidade B, (6) subunidade A; (D) solução estoque de vacina dT.

Figura 8. Perfis de eluição dos sobrenadantes das amostras de MSdT em função do tempo. As amostras de MSdT foram mantidas a 37°C por 42 dias. Semanalmente, uma amostra era retirada e o sobrenadante, injetado em coluna de exclusão por peso molecular (QC-PAK GFC 300; 0,6 mL/min).

Ora, sabe-se que a degradação da matriz polimérica quando em ambiente aquoso é um processo complexo envolvendo uma série de fatores (Göpferich, 1996): começa com o inchaço da matriz pela penetração de água. Segue-se uma degradação química do polímero, produzindo oligômeros e monômeros (esquema 3). A degradação progressiva provoca o aparecimento de poros pelos quais há liberação dos oligômeros e monômeros. Paralelamente, o pH no interior dos poros começa a ser controlado pelos produtos de degradação (esquema 3). Todo este processo é acompanhado por uma perda de massa da estrutura, acompanhada da liberação do material encapsulado, proteínas encapsuladas, ácido láctico, ácido glicólico e oligômeros.

Esquema 3. Esquema de degradação de PLGA em meio aquoso.

Desse modo, para verificar se a degradação protéica observada das anatoxinas foi devida ao pH e à presença das substâncias decorrentes da hidrólise do PLGA, ou somente ao estresse decorrente do processo de produção das microesferas, realizou-se a incubação de microesferas brancas com solução de dT (20 Lf/mL de TTxd e 4Lf/mL de DTxd), na proporção de 5 mg de microesferas/mL de dT em PBS contendo timerosal (120 ppm), em banho a 37 °C sob agitação suave. Uma vez por semana, num total de 5 semanas, um frasco foi retirado e guardado em freezer (-20°C) até a realização dos ensaios de caracterização. Paralelamente, fez-se um controle com a vacina sem microesferas, mantida nas mesmas condições. Para a realização dos testes, as

suspensões foram descongeladas e centrifugadas (2000g/10 min) e os sobrenadantes analisados em termos de pH, ELISA, por dicroísmo circular (CD) e por HPLC.

O pH do sobrenadante das amostras com microesferas apresentou uma queda no decorrer do tempo (figura 9). No controle (dT livre) não houve variação de pH.

Figura 9. Variação de pH em função do tempo da suspensão de MS (●) e de vacina dT livre (■).

A atividade antigênica da TTxd, determinado por ELISA Lf na suspensão de MS com dT livre apresentou uma redução discreta no decorrer do tempo (tabela 9). Para DTxd, a redução de atividade entre a primeira e a quinta semana foi bem maior, da ordem de 35%. Seria de se esperar, porém, valores menores de redução percentual de atividade: o controle, constituído de uma mistura das anatoxinas apresentou uma queda de atividade de aproximadamente 10% para TTxd e de aproximadamente 15% para DTxd, assim como dados da literatura (Galazka *et al.*, 1998) que são concordantes em mostrar que as anatoxinas são bastante estáveis por um período de várias semanas a 37°C.

Tabela 9. Atividade antigênica das frações tetânica e diftérica após incubação por 5 semanas a 37°C de vacina dT livre e com microesferas brancas (média de 3 experimentos).

		Semana					
		0	1	2	3	4	5
Atividade antigênica (Lf/mL)	Vacina dT livre – Controle						
	TTxd	20,5"0,8	21,1"0,3	19,6"0,8	20"2	19"1	18,5"0,6
	DTxd	4,1"0,9	3,5"0,4	3,9"0,8	3,6"0,6	3,7"0,3	3,4"0,5
	Vacina dT livre com MS brancas						
	TTxd	22,1"0,7	23"1	24"2	22,5"0,6	19,2"0,4	19,4"2
	DTxd	3,8"0,1	3,94"0,04	2,30"0,02	0,318"0,007	0,769"0,05	1,39"0,06

Por CD (figura 10) não foi possível observar alterações estruturais que justificassem a diminuição da atividade imunogênica das anatoxinas (tabela 9): não há alteração de perfil (figura 10A) nem de valor da elipticidade molar a 222 nm (figura 10B). Uma vez que a fração tetânica é preponderante na mistura (em mg_{proteína}/mL: 90,3% TTxd e 9,7% DTxd) e que nela não houve alteração no reconhecimento antigênico, fica claro que houve um mascaramento da possível alteração conformacional da DTxd que explicaria o resultado obtido por ELISA Lf.

Figura 10. (A) Espectro de CD de solução estoque de vacina dT (—), mantida por 5 semanas com MS a 37°C (—) e livre, nas mesmas condições (—). (B) Elipticidademolar a 222 nm das mesmas soluções.

Em relação ao cromatograma de HPLC, nota-se uma diferença pequena, novamente, no período de 8 a 11 minutos (figura 11). Os dados da tabela 12 (anexo) indicam mais claramente um aumento relativo na concentração de uma espécie com tempo de retenção igual ao da subunidade B no decorrer do tempo. Já para TTxd, não houve nenhum efeito deletério aparente.

Figura 11. Perfil de eluição dos sobrenadantes das amostras de vacina dT mantidas a 37°C por 5 semanas na presença de MS (coluna QC-PAK GFC 300; 0,6 mL/min).

Já foi mostrado que a presença de timerosal e de ácido láctico parece ser uma combinação particularmente perigosa para proteínas como DTxd (Namur *et al.*, 2004). Nesse tipo de sistema, o timerosal reduzido a ácido tiosalicílico na presença de ácido láctico (pH 4) induz a redução da ponte SS que mantém as subunidades A e B da anatoxina diftérica, separando-as e provocando perda de atividade (Namur *et al.*, 2004). Explica-se assim a queda significativa de atividade antigênica da fração diftérica tanto no experimento de cinética de liberação *in vitro* como o de estabilidade das proteínas na presença de microesferas brancas. As implicações imediatas dessa constatação em conjunto com os dados experimentais de HPLC é deixar de usar o timerosal como conservante para este tipo de ensaio de estabilidade. A redução da ponte SS na TTxd, se houve, parece não interferir nos aspectos antigênicos ou estruturais, como determinados por CD.

Para evitar os efeitos deletérios do pH ácido e do timerosal, simulando mais fielmente uma condição fisiológica, realizou-se o segundo ensaio de cinética *in vitro*. Em períodos determinados, a suspensão de MSdT em PBS era centrifugada, o sobrenadante, congelado, e as microesferas recebiam novo PBS. Neste experimento utilizou-se timerosal a uma concentração baixa (cerca de 10% da concentração usada nos primeiros experimentos), para reduzir sua interferência nos ensaios de HPLC.

No sobrenadante das microesferas incubadas fez-se a determinação do pH, de concentração protéica, de atividade antigênica e de lactato.

O perfil crescente da concentração de lactato em função do tempo de incubação das MS indicou sua degradação em um modo pulsátil e, pelo menos, trifásico, consistindo de um pulso inicial, seguido de um período de liberação mais lenta e, posteriormente, de um outro pulso (figura 12C). Como o tampão era trocado semanalmente, evitaram-se quaisquer danos relacionados à queda de pH.

Quanto à liberação das anatoxinas, observou-se (figuras 12A e 12B) uma liberação crescente das anatoxinas. A fração diftérica foi praticamente 100% liberada, enquanto que a fração tetânica, ainda que apresentando um perfil semelhante, atingiu no máximo 65% do esperado. Este nível de liberação pode

ser consequência da precipitação e da adsorção da TTxd no interior das microesferas ou pela perda de atividade da anatoxina liberada. Possivelmente, os dois fatores ocorrem concomitantemente. Há dados na literatura onde formulações de anatoxina tetânica em microesferas sem estabilizadores, como BSA ou trealose não liberam toda a proteína encapsulada, em decorrência da adsorção da proteína na superfície do polímero devido a fortes interações hidrofóbicas e à agregação protéica. Mesmo na presença dos estabilizadores a liberação de TTxd encapsulada ficar abaixo de 70% (Johansen *et al.*, 1998).

Figura 12. Cinética de liberação *in vitro* de MSdT. (A) percentual de DTxd liberada das microesferas em relação à concentração total; (B) percentual de TTxd liberada das microesferas em relação à concentração total; (C) concentração de lactato no sobrenadante; (D) concentração de proteína total no sobrenadante. Cada ponto é média de três experimentos.

Levando em conta que uma vacina de dose única deve ser capaz de provocar um estímulo do sistema imunológico semelhante àquele obtido após várias doses das vacinas convencionais, a liberação do antígeno de modo pulsátil, como aquele observado, é o mais adequado.

A análise qualitativa dos perfis de eluição dos sobrenadantes das microesferas por HPLC (figura 13) indica a presença de proteínas degradadas, isto é, de peso molecular menor (tempo de retenção maior) já a partir de uma semana de incubação. Isto fica ainda mais evidente quando se analisam os dados da tabela 13 (anexo). Tais espécies de peso molecular mais baixo podem ser decorrentes da hidrólise das anatoxinas no microambiente ácido das microesferas. É curioso notar que não foi observado o pico correspondente ao monômero da DTxd, somente o dímero nas segunda e terceira semana, além das subunidades A e B, sobretudo ao final do experimento, no 157º dia. No experimento realizado não foi possível observar a formação de agregados protéicos.

Sabendo que, do ponto de vista molecular, a redução do pH no microambiente das microesferas é fator desencadeante dos processos de degradação protéica observados até aqui, realizaram-se estudos de dicroísmo circular (CD) e de fluorescência para identificar, ainda que a grosso modo, as alterações conformacionais que precedem os eventos de degradação das anatoxinas em função do pH.

Figura 13. Perfis de eluição por HPLC (coluna QC-PAK GFC 300, 0,6 mL/min, detecção a 280 nm) dos sobrenadantes das amostras de MSdT mantidas a 37°C por 120 dias.

Amostras de vacina dT foram preparadas a 20 Lf/mL (Ttxd) e a 4Lf/mL (Dtxd) em tampão acetato 40 mmol/mL em quatro valores de pH diferentes (7,0, 6,0, 5,0 e 4,0). Todos contendo timerosal a 120 ppm. As amostras foram mantidas a 37 °C por duas semanas. Após este período, as soluções foram submetidas a análise por CD (figura 14) e por fluorescência no UV (figura 15).

Na figura 14 têm-se os valores de elipticidade molar a 222 nm em função do pH da solução de TTxd (figura 14 A), DTxd (figura 14 B) e vacina dT (figura 14 C). É possível observar claramente que a TTxd apresenta uma alteração conformacional, representada aqui pela redução do conteúdo de α -hélice em função da queda do pH. Este fato é refletido na vacina dT, porém, não é observado na DTxd. Sugere-se, então, uma relação de causa e efeito na redução da atividade antigênica observada no experimento de cinética de liberação *in vitro*. Isto, em relação à TTxd. Quanto à DTxd, os experimentos de fluorescência adiante foram mais esclarecedores.

Figura 14. Elipticidade molar a 222 nm em função do pH para (A) TTxd; (B) DTxd e (C) vacina dT.

Para determinar a fluorescência intrínseca do triptofano, foi adotado $\lambda_{\text{excitação}}$ de 280 nm. O Trp tem pico de emissão a 330 nm em ambientes hidrofóbicos. Em ambiente hidrofílico, o pico é a 350 nm (Schmid, 1990). Levando

em conta que, com uma excitação a 280 nm a fluorescência é quase toda decorrente de Trp, pode-se determinar o padrão de enovelamento protéico a partir da relação de fluorescência a 350 nm e a 330 nm (figura 15).

Figura 15. Relação de fluorescência a 350 nm e a 330 nm para TTxd (A, D), DTxd (B, E) e vacina dT (C, F). Os espectros foram realizados em soluções recém-preparadas (A, B e C) e em soluções mantidas a 37°C por 14 dias (B, D e F).

Não houve o deslocamento do pico de fluorescência de 320-330 nm para 350 nm (conhecido como “red-shift”) para as amostras de TTxd e de DTxd recém-preparadas. Para aquelas mantidas a 37°C por duas semanas observou-se uma tendência de aumento da fluorescência a 350 nm em relação àquela a 330 nm (figura 15), nas amostras mantidas a pH 4. Isto indicaria um desenovelamento das proteínas com uma maior exposição dos resíduos de Trp ao ambiente aquoso. Em um experimento semelhante, Paliwal (Paliwal & London, 1996) mostrou um claro deslocamento para 350 nm no espectro de anatoxina diftérica mantida em soluções ácidas. No entanto, uma diferença desse experimento apresentado aqui em relação àquele publicado foi a gama de pH's utilizada. Foram utilizados apenas quatro pontos, contra seis (inclusive a pH's mais baixos) no trabalho de

Paliwal. Desse modo, para que se pudesse observar melhor o efeito do pH sobre a estrutura terciária das proteínas, foi feito um novo estudo, dessa vez com alguns ajustes: soluções de Dtxd e de Ttxd foram preparadas a 20 Lf/mL (4,81 mg/mL de proteína e 4,75 mg/mL de proteína, respectivamente) em tampão fosfato 100 mmol/L em oito pHs diferentes (2,5, 3,5, 4,5, 5,5, 6,5, 7,5, 8,5 e 9,5). Todas as soluções, para evitar interferência, foram preparadas sem timerosal. As amostras foram, então, submetidas à análise por fluorescência no UV (figura 16).

Figura 16. Relação de fluorescência a 350 nm e a 330 nm para TTXd (A) e para DTxd (B).

Para ambas as anatoxinas foram observadas alterações na intensidade de fluorescência a 330 nm a pHs mais baixos. Além de um aumento mais claro da relação F_{350}/F_{330} para pHs mais baixos em ambas as proteínas. Os pontos de inflexão foram aproximadamente a pH 4,5 para Dtxd e a pH 4 para Ttxd. Isto está de acordo com os outros dados, como de CD, onde se vê uma alteração no perfil a pH 4 (figura 14) e de antigenicidade, em que se observa uma perda acentuada de atividade antigênica nos valores de pH mais baixos (figuras 6 e 9). Ou seja, para TTXd, além de uma alteração no conteúdo de α -hélice, mostrado aqui por um aumento no valor de elipticidade molar a 222 nm, há também um desenovelamento com uma maior apresentação dos resíduos hidrofóbicos com a

redução do pH. Já com relação à DTxd, não ficou evidente uma diminuição no conteúdo de α -hélice, mas certamente houve um desenovelamento da estrutura com uma maior exposição dos resíduos hidrofóbicos.

Assim, no sistema estudado, pode-se dizer que são ao menos dois os fatores responsáveis pela redução da atividade antigênica da vacina dT encapsulada nas microesferas de PLGA: o conhecido estresse protético durante a microencapsulação, com todos os efeitos do cisalhamento e do contato com a interface água-solvente orgânico e o microambiente ácido (pH abaixo de 5) no interior das microesferas durante erosão e hidrólise da matriz polimérica em meio aquoso.

Restava saber se, a despeito da degradação estrutural, a formulação obtida de MSdT seria capaz de induzir uma resposta imunológica *in vivo*.

Experimentos *in vivo*

Os resultados mostrados até agora sugerem que há uma degradação parcial das anatoxinas encapsuladas. Já foi mostrado que, apesar da desnaturação, a TTxd manteve a atividade imunogênica em um experimento com camundongos, induzindo, com uma formulação em PLGA, uma resposta humoral protetora (Kersten *et al.*, 1996). Sabendo ser fundamental para o sucesso de uma vacina de dose única que a anatoxina liberada pela microesfera não sofra uma degradação extensiva e que continue imunogênica, produzindo não apenas anticorpos neutralizantes, mas sobretudo memória (Sant'Anna *et al.*, 2004), realizaram-se ensaios em animais com o intuito de avaliar até que ponto a redução de atividade antigênica observada interferiria na resposta imunogênica das vacinas.

Comparação do efeito adjuvante da MSdT com a vacina dT livre e do intervalo de tempo para aplicação da dose de reforço

A extensão do efeito adjuvante das microesferas em relação ao antígeno livre e a efetividade das microesferas na indução de memória imunológica com dois esquemas de imunização foram avaliadas em camundongos (Materiais e Métodos item 22.1).

Os animais receberam todas as doses de vacina por via intraperitoneal e, no momento indicado, foram sangrados. Os títulos dos anticorpos foram determinados de duas formas: (a) ELISA direto (Materiais e métodos item 12) e por ToBI (b) (Materiais e métodos item 11).

Resposta primária

Não se detectou a presença de IgG (por ELISA), nem a presença de anticorpos neutralizantes (por ToBI) anti-DTxd nem anti-TTxd (figuras 17 e 18) em soros de camundongos 15 dias após a 1^o dose da vacina dT solúvel e da vacina MSdT.

Resposta secundária próxima (reforço ao 36^o dia)

Os títulos de IgG anti-TTxd e anti-DTxd no grupo que recebeu a vacina microencapsulada são semelhantes aos observados naqueles que receberam a vacina solúvel (figura 17). Em relação à presença de anticorpos neutralizantes contra as duas frações, ambos os grupos, MSdT e vacina livre, não apresentaram diferenças significativas (figura 18). É importante salientar que estas respostas secundárias foram sempre menores do que 10UI/mL para anti-TTxd e menores do que 2 UI/mL para DTxd (figuras 18A e 18B).

Resposta secundária tardia (reforço ao 93^o dia)

De modo geral os títulos de anticorpos, sejam IgG totais, sejam anticorpos neutralizantes, foram maiores para os grupos de resposta tardia em relação àqueles de resposta próxima, para ambas as frações. Os títulos de IgG anti-DTxd induzido em camundongos imunizados com MSdT (2^{14}) foram 60 vezes maiores do que os obtidos nos animais imunizados com a vacina dT livre (2^8). Os títulos de IgG anti-TTxd do grupo MSdT (2^{16}) foram 16 vezes maiores do que o que recebeu a vacina dT livre (2^{12}). Quanto aos títulos de anticorpos neutralizantes anti-DTxd e anti-TTxd, observou-se que os animais que receberam MSdT apresentaram títulos 3,6 e 3 vezes respectivamente maiores do que o grupo que recebeu a vacina dT livre.

Figura 17. Cinética de formação de **IgG total** antitetânicos (A e C) e antidiftéricos (B e D) em camundongos. Os animais receberam a vacina dT livre (— e —) ou MSdT (— e —) em dois esquemas de imunização: de resposta próxima (A e B) e tardia (C e D). A seta indica a aplicação de reforço (36º dia para resposta próxima e 93º dia para resposta tardia).

Figura 18. Cinética de formação de **anticorpos neutralizantes** antitetânicos (A e C) e antidiftéricos (B e D) em camundongos. Os animais receberam a vacina dT livre (— e —) ou MSdT (— e —) em dois esquemas de imunização: de resposta próxima (A e B) e tardia (C e D). A seta indica a aplicação de reforço (36º dia para resposta próxima e 93º dia para resposta tardia).

Ao se compararem os títulos anti-DTxd dos grupos imunizados com MSdT de resposta tardia (figura 17D) e próxima (Figura 17B) observou-se uma diferença de 250 vezes. De modo semelhante, comparando os títulos de anti-TTxd dos grupos imunizados com MSdT de resposta próxima (figura 17A) e tardia (figura 17C) observou-se uma diferença de 1024 vezes.

Com relação à fração diftérica, observou-se, no grupo de resposta tardia (figura 18D) que, quando se compararam os títulos de anti-DTxd neutralizantes produzidos por animais imunizados com MSdT (57 UI/mL) com aqueles imunizados com a vacina dT livre (16 UI/mL) ocorreu um aumento de 3,6 vezes. Ao se compararem os títulos anti-DTxd neutralizantes dos grupos imunizados com MSdT de resposta tardia (figura 18D) e próxima (Figura 18B) houve uma diferença de 114 vezes.

Em relação à fração tetânica, observou-se, no grupo de resposta tardia (figura 18C), que quando se compararam os títulos de anti-TTxd neutralizantes produzidos por animais imunizados com MSdT (180 UI/mL) com aqueles imunizados com a vacina dT livre (55 UI/mL) houve um aumento de 3 vezes. Assim como com a fração diftérica, ao se compararem os títulos de anti-TTxd neutralizantes dos grupos imunizados com MSdT de resposta próxima (figura 18A) e tardia (figura 18C) observou-se uma diferença de 28 vezes.

Desse modo, tanto para a fração tetânica quanto para a diftérica, a microencapsulação de dT em PLGA aumentou a formação de anticorpos com relação a vacina solúvel em 3 vezes. Observou-se um efeito sinérgico de 28 (tétano) a 114 (Difteria) vezes em relação à microencapsulação de DTxd ou TTxd (respectivamente) ao se fazer uma injeção tardia da dose de reforço.

A formação de anticorpos neutralizantes (resposta secundária do grupo de resposta tardia) tanto anti-DTxd quanto anti-TTxd dos animais que receberam MSdT foi, pelo menos, 3 vezes maior do que daqueles animais que receberam a vacina dT livre (figuras 18C e 18D). O soro dos animais dos grupos que receberam o reforço tardiamente (93° dia) foi 28 vezes mais potente do que daqueles que receberam a dose de reforço em tempo menor (36° dia).

A microencapsulação não alterou significativamente os títulos de IgG e de anticorpos neutralizantes para os componente tetânico e diftérico, na

resposta secundária próxima. Ao contrário do observado na resposta secundária tardia, em que os títulos de IgG tanto anti-DTxd quanto anti-TTxd nos animais que receberam MSdT foram significativamente maiores do que aqueles que receberam a vacina dT livre.

Para as duas frações, tetânica e diftérica, a microencapsulação de dT em PLGA aumentou a potência da vacina solúvel em 60 vezes. Observou-se um efeito sinérgico de 250 (Difteria) a 1024 (Tétano) vezes em relação à microencapsulação de DTxd ou de TTxd (respectivamente) ao se fazer uma injeção tardia da dose de reforço. No modelo proposto, não foi possível avaliar a resposta primária. Todos os animais do experimento ganharam peso e mantiveram aspecto saudável no período do teste, indicando ausência de reações tóxicas das vacinas testadas.

Comparação do efeito adjuvante da MSdT com a vacina dT adsorvida em gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ e do intervalo de tempo para aplicação da dose de reforço

Uma vez que são praticamente os únicos adjuvantes para uso humano e, pelo histórico de sucesso em vacinas desde a década de 20, não é surpresa que um novo adjuvante para ser aprovado para uso humano deve ter uma ação igual, ou melhor, do que os sais de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$ ou AlPO_4) (Cox & Coulter, 1997). Neste sentido realizaram-se experimentos tendo como controle padrão a vacina dT adsorvida em gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Materiais e métodos, item 22.2). O objetivo aqui era avaliar a indução de anticorpos em camundongos por comparação com a vacina convencional em termos de intensidade e de memória.

Após as sangrias o título dos anticorpos neutralizantes anti-DTxd e anti-TTxd nos soros foram determinados de duas formas: (a) ToBI e (b) ELISA direto para os títulos de IgG_1 e IgG_{2a} .

A. Detecção de anticorpos neutralizantes por ToBI.

Semelhantemente ao descrito para o experimento anterior, após a primeira injeção de vacina (resposta primária) (figura 19) não se observou, por ToBI, títulos de anticorpos neutralizantes anti-TTxd nem anti-DTxd em ambos os esquemas de imunização (figura 19) quarenta dias após a imunização. Quando a injeção de reforço foi ao 44º dia (figura 19A e 19C) as diferenças nas formações de anti-

TTxd e anti-DTxd quer seja para a MSdT ou para a vacina adsorvida em gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ não foram significativas (figura 19A e 19B). Em contrapartida, para todos os grupos, quando a segunda injeção de vacina foi no 111º dia (figura 19B e 19D) tanto a formação de anti-TTxd quanto a de anti-DTxd foram superiores aos daqueles grupos que receberam a dose de reforço no 44º dia.

Quanto à fração tetânica, observou-se, no grupo de resposta tardia (figura 19B), que quando se compararam os títulos de anti-TTxd produzidos por animais imunizados com MSdT (60 UI/mL) com aqueles imunizados com a vacina dT adsorvida em gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ (5 UI/mL) houve um aumento de 12 vezes. Ao se compararem os títulos de anti-TTxd dos grupos imunizados com MSdT de resposta próxima (figura 19A) e tardia (figura 19B) observou-se uma diferença de 3 vezes.

Com relação à fração diftérica, observou-se, no grupo de resposta tardia (figura 19D) que quando se compararam os títulos de anti-DTxd produzidos por animais imunizados com MSdT (10,5 UI/mL) com aqueles imunizados com a vacina adsorvida em gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ (2 UI/mL) ocorreu um aumento de quase 5 vezes. Ao se compararem os títulos anti-DTxd dos grupos imunizados com MSdT de resposta tardia (figura 19D) e próxima (Figura 19C) observou-se uma diferença de aproximadamente 20 vezes.

Figura 19. Cinética de formação de **anticorpos neutralizantes** antitetânicos (A e B) e antidiftéricos (C e D) em camundongos. Os animais receberam a vacina dT em gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ (— e —) ou MSdT (— e —) em dois esquemas e imunização: de resposta próxima (A e C) e tardia (B e D). A seta indica a aplicação do reforço (44º dia para resposta próxima e 111º dia para resposta tardia).

B. Detecção de anticorpos circulantes (IgG_1 e IgG_{2a}) por ELISA.

O objetivo dessa titulação é determinar o padrão de resposta obtido em cada esquema de imunização, bem como avaliar maturação das respostas obtidas. Sabe-se que dos subtipos de IgG , o que aparece primeiro é do tipo IgG_1 , seguido pelo isotipo IgG_3 e finalmente pela IgG_{2a} . Ainda que a soroneutralização seja em grande parte decorrente do IgG_1 (mais abundante), o IgG_{2a} , que aparece tardiamente em relação à IgG_1 , é mais específico e sua determinação indica o grau de maturação do sistema imunológico frente a um determinado imunógeno.

Para se avaliar até que ponto as microesferas foram capazes de maturar e estimular uma resposta de memória nos animais que receberam MSdT, realizaram-se a determinação dos títulos de IgG_1 e de IgG_{2a} antidiftéricos e antitetânicos nos soros dos camundongos que receberam MSdT e vacina dT adsorvida em gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$.

Figura 20. Cinética de formação de **IgG₁** antitetânico (A e B) e antidiftérico (C e D) em camundongos. Os animais receberam a vacina dT em gel de Al(OH)₃ (— e —) ou MSdT (— e —) em dois esquemas e imunização: resposta próxima (A e C) e tardia (B e D). A seta indica a aplicação do reforço (44º dia para resposta próxima e 111º dia para resposta tardia).

Figura 21. Cinética de formação de **IgG_{2a}** antitetânico (A e B) e antidiftérico (C e D) em camundongos. Os animais receberam a vacina dT em gel de Al(OH)₃ (— e —) ou MSdT (— e —) em dois esquemas e imunização: resposta próxima (A e C) e tardia (B e D). A seta indica a aplicação do reforço (44º dia para resposta próxima e 111º dia para resposta tardia).

Como observado anteriormente, tanto a formação de IgG₁ quanto a de IgG_{2a} para o grupo que recebeu o reforço ao 44º dia (figuras 20 e 21) foi menor do que o grupo que recebeu o reforço ao 111º dia, para os animais imunizados com MSdT.

Em relação aos títulos de IgG₁, o grupo de resposta próxima, para a fração tetânica apresentou níveis equivalentes de anti-TTxd tanto para os animais que receberam MSdT quanto aqueles imunizados com vacina dT adsorvida em gel de Al(OH)₃ (figura 20A). Já os títulos de IgG₁ anti-DTxd naqueles animais que receberam MSdT foram aproximadamente 5 vezes maiores do que aqueles que receberam a vacina adsorvida no grupo de resposta próxima (figura 20C). Ao se observar o padrão de resposta de IgG₁ no grupo de resposta tardia, percebe-se a indução de anti-TTxd 128 vezes e de anti-DTxd 16 vezes maior naqueles animais que receberam MSdT em relação ao grupo que recebeu a vacina adsorvida em gel de Al(OH)₃. (figuras 20B e 20D)

Quanto aos títulos de IgG_{2a}, os animais do grupo de resposta próxima apresentaram títulos com diferenças não significativas tanto anti-TTxd quanto anti-Dtxd (figuras 21A e 21C). Já o grupo de resposta tardia, isto é, que receberam o reforço ao 111º dia, para a fração tetânica, a diferença chegou a ser de 22 vezes (figura 21B) e de 16 vezes para a fração diftérica (figura 21D).

Apesar das diferenças entre os grupos não serem tão grandes quanto aquelas observadas no primeiro experimento, em que se comparou as respostas induzidas por MSdT e por vacina dT livre, é possível observar que, **tanto quanto o gel de Al(OH)₃, a vacina em microesferas de PLGA é capaz de induzir uma resposta imunológica neutralizante contra ambos os antígenos, como determinada por ToBI, e sobretudo de memória, com uma maturação do sistema imunológico e aumento da especificidade. Na maioria das vezes as respostas induzidas pela MSdT foram maiores àquelas obtidas para os grupos controle.**

Assim, os dados em conjunto desses dois experimentos mostram que a vacina encapsulada em microesferas (MSdT) foi capaz de induzir uma resposta imunológica mesmo considerando a degradação observada *in vitro* e que a manipulação do esquema de imunização concomitante com a

microencapsulação das anatoxinas não só aumenta o título de anticorpos, mas também sua especificidade. Cabe ressaltar que, como anteriormente, todos os animais do experimento ganharam peso e mantiveram aspecto saudável no período do teste.

Efeito da via de imunização na resposta induzida por MSdT em comparação com vacina dT livre

A grande vantagem das microesferas como adjuvantes em vacinas é a possibilidade de uso em várias formas de administração. Além da via parenteral, as vias nasal e oral são vias de escolha para o uso de microesferas. Elas protegem o antígeno e permitem a sua captura pelas células imunocompetentes, tanto no sistema nasal quanto no digestivo, favorecendo respostas imunológicas locais e sistêmicas (Fattal, 2003).

Com a comprovação da imunogenicidade da vacina MSdT pela via intraperitoneal nos experimentos descritos anteriormente, realizou-se um estudo com camundongos, para avaliar o tipo e o padrão de resposta obtida por 3 vias de inoculação diferentes: nasal, oral e intraperitoneal, por comparação com o antígeno livre administrado pelas mesmas vias.

Utilizou-se o lote 3 de microesferas (tabela 7), cuja microscopia de varredura (figura 22) mostrou a presença de partículas de tamanho variável (de 2 a 25 μm , média de 10 μm).

Figura 22. Micrografia eletrônica de MSdT lote 3. (A) aumento de 5000H. (B) aumento de 3000H.

Foram 3 grupos (e respectivos controles), conforme descrito no item 22.3 de Materiais e métodos. Os animais receberam a vacina e o controle e, a cada 2 semanas, os animais foram sangrados e o título de anticorpos nos soros, determinado por ELISA direto. Nenhum animal apresentou perda de peso e todos mantiveram aspecto saudável no período do teste. Determinaram-se os títulos de IgA sérico, IgG₁, IgG_{2a} e IgM anti-DTxd e anti-TTxd. Os resultados obtidos encontram-se nas figuras 23 e 24.

Considerando primeiramente a formação de anticorpos anti-DTxd, tem-se o seguinte panorama:

Via oral: Houve uma produção de IgA significativamente maior para o grupo que recebeu MSdT;

Houve indução de IgM e de IgG_{2a}, em níveis semelhantes ao do controle. Apesar da indução de IgM, não se observou a mudança da resposta para IgG₁, que não foi induzido em nenhum dos dois grupos.

Via nasal: IgA anti-DTxd foi praticamente ausente para os dois grupos, o mesmo ocorrendo para IgG₁;

IgM apresentou alguma produção ainda que pequena e significativamente maior ao 42º dia no grupo que recebeu MSdT;

IgG_{2a} teve uma indução menor do que o controle, na segunda semana, mas, após o reforço, o controle decaiu ligeiramente até o 42º dia, enquanto que o grupo que recebeu MSdT apresentou uma tendência de alta.

Via intraperitoneal: houve uma indução fraca de IgA, mas 8 vezes maior que IgM, principalmente após o reforço, no grupo que recebeu MSdT;

Paralelamente, a indução de IgG_{2a} foi alta após o reforço e manteve-se relativamente constante até a 6ª semana, sempre 16 vezes maior do que o controle. O mesmo vale para IgG₁, sendo que a resposta do grupo que recebeu MSdT foi 128 vezes maior do que o controle.

Já para os anticorpos anti-TTxd (figura 24), o comportamento foi um pouco diferente:

Via oral: após o reforço a indução de IgA foi significativamente maior nos animais que receberam MSdT e, em ambos os casos (controle e MSdT) a resposta se manteve até o 42º dia;
A indução de IgM não foi muito intensa, nem houve diferença significativa entre os dois grupos;
O perfil foi semelhante para IgG₁ e IgG_{2a}: praticamente não foi induzido em nenhum dos grupos.

Via nasal: por esta via todos os grupos apresentaram respostas semelhantes, principalmente em termos de IgG₁ e de IgG_{2a}: a indução foi baixa tanto para o grupo controle quanto para o grupo MSdT;
A indução de IgA apresentou um perfil crescente e maior do que o controle para os animais que receberam MSdT. O mesmo ocorreu para o IgM.

Via intraperitoneal: a indução de IgA foi muito baixa, praticamente nula para o controle e para o grupo MSdT;

IgM foi induzido já a partir da primeira semana e manteve-se mais ou menos constante, sem diferenças significativas entre os dois grupos até o 42º dia;

Quanto à indução de IgG_{2a}, após o reforço a diferença entre os dois grupos foi duas vezes maior para o grupo que recebeu MSdT, sendo que se manteve quase constante. À 42ª semana a diferença entre os dois grupos deixou de ser significativa;

O IgG₁ teve uma indução bastante intensa particularmente após o reforço e 32 vezes maior para o grupo MSdT. Além disso, a resposta manteve-se praticamente constante.

Os dados apresentados mostram que a MSdT produziu um estímulo em todas as vias de imunização testadas. Apesar dos avanços nas pesquisas, os mecanismos pelos quais as microesferas estimulam a resposta imunológica ainda são obscuros. O efeito adjuvante das partículas parece ser uma consequência de sua internalização pelas células dendríticas e macrófagos nos nódulos linfáticos (Singh & O'Hagan, 1999). Pelas vias nasal e oral um fator importante adicional é o tamanho das partículas. O padrão de resposta é dependente do tamanho: partículas maiores que 5 µm não são internalizadas, permanecem na mucosa e estimulam uma resposta de mucosa. Já aquelas menores que 5 µm são internalizadas e transportadas para os nódulos linfáticos, onde estimulam respostas sistêmica e de mucosa (Pretzke, 2000).

Houve indução de IgM pelas três vias e contra os dois antígenos, indicando uma sensibilização imunológica que foi, no mínimo, igual àquela obtida com o controle. É sabido que o IgM é a primeira resposta do sistema imunológico a um antígeno e ocorre antes da maturação. Essa maturação, que depende do antígeno, costuma ocorrer após mais uma, duas ou mais doses, mas uma exposição contínua ao antígeno em doses baixas também leva a uma maturação. Essa maturação pode ser reconhecida com a queda dos níveis de IgM e do aumento gradual de IgG ou de IgA.

Observa-se nas figuras 23 e 24 que há claramente uma sensibilização por todas as três vias de imunização analisadas e que a resposta secundária foi direcionada a T_H1 ou T_H2 (vide adiante), isto é, maturada, no mínimo em nível igual ao controle.

Alguns trabalhos publicados mostram que a imunização por via oral com microesferas de PLGA induziu, em camundongos, respostas de mucosa e sistêmica para os antígenos encapsulados. Jones e colaboradores (1996) mostraram que uma vacina experimental contendo fímbria de *Bordetella pertussis* em microesferas de PLGA foi capaz de induzir uma resposta protetora. O mesmo ocorreu em um experimento em que uma formulação vacinal em microesferas por via oral protegeu camundongos contra uma infecção de *Salmonella typhimurium* (Allaoui-Attarki *et al.*, 1997). Os dados aqui apresentados mostram que a vacina MSdT foi capaz de induzir uma resposta de IgA sérico e de IgG contra ambos os

antígenos. A presença de IgA sérico é um indicativo de que há uma resposta de mucosa.

Quanto à imunização por via nasal, os resultados foram menos animadores, mas não menos significativos: a indução de IgM mostra que houve sensibilização do sistema imunológico dos animais e, ainda que fraca, houve uma indução de IgA sérico contra ambos os antígenos e uma resposta de IgG_{2a} para fração diftérica. Uma vez que a formulação de microesferas utilizada apresentava uma população polidispersa em termos de tamanho (figura 22), com diâmetros variando de 2 a 25 μm e média de 10 μm e, levando em conta que as partículas maiores que 5 μm tendem a induzir uma resposta local (Pretzke, 2000), a visualização de uma resposta imunológica mais evidente por esta via acabou sendo prejudicada, pois no experimento analisou-se apenas a concentração de anticorpos séricos. Ainda assim, pode-se admitir que a presença de IgA sérico seja indicativo de uma resposta de mucosa.

Pela via intraperitoneal, a efetividade das microesferas foi mais evidente, especialmente para a fração diftérica em que os títulos obtidos de IgG (os dois subtipos) foram bastante elevados e persistentes após o reforço. Comparando a relação IgG₁/IgG_{2a} para os diferentes grupos (figura 25) observa-se que, para a fração diftérica pelas vias de imunização oral e nasal o direcionamento foi totalmente para IgG_{2a}, indicando uma tendência de resposta do tipo T_H1, especialmente após o reforço ao 14^o dia. Entretanto para ambas as vias, não houve diferença entre os animais do grupo controle e aqueles que receberam MSdT. Para a via intraperitoneal observa-se em uma semana uma tendência de resposta do tipo T_H1, com um nível maior de IgG_{2a} do que de IgG₁. Todavia, após o reforço, em todos os grupos, mas particularmente naquele que recebeu MSdT, observa-se um deslocamento para uma resposta do tipo T_H2 com a concomitante queda dos níveis de IgM e o aumento de IgG₁, indicando uma maturação na resposta imunológica.

Para a fração tetânica, pela via nasal, apesar de baixa a resposta tende para padrão T_H1, enquanto que o controle tende para T_H2. Quando a via é oral, o resultado é semelhante, sem, no entanto, haver uma diferença significativa entre os grupos. Como seria de se esperar, após a dose de reforço, há um aumento da

resposta padrão T_H2 , mas não há uma redução nos níveis de IgM, o que significa que há a necessidade de mais tempo ou de outra dose de reforço para que se observasse a maturação da resposta. Quando se analisa o resultado para a via intraperitoneal, observa-se o padrão de resposta do tipo T_H2 , em especial após a dose de reforço. Aqui, como esperado, há uma queda nos níveis de IgM enquanto aumentam os de IgG₁ e mesmo de IgG_{2a}, em especial para o grupo MSdT. Isto indica que **a vacina encapsulada (MSdT) foi capaz de estimular o sistema imunológico adequadamente e com uma resposta de memória, induzida após a aplicação de uma dose de reforço sem adjuvante.**

Figura 23. Cinética de formação de anticorpos **anti-DTxd**: IgA (A1, A2, A3), IgM (B1, B2, B3), IgG2a (C1, C2, C3) e IgG1 (D1, D2, D3) em camundongos imunizados com vacina MSdT (—), ou controle (—, — e —) por via nasal (A1, B1, C1, D1), oral (A2, B2, C2, D2) e intraperitoneal (A3, B3, C3, D3). O reforço foi aplicado ao 14º dia.

Figura 24. Cinética de formação de **anti-TTxd**: IgA (A1, A2, A3), IgM (B1, B2, B3), IgG_{2a} (C1, C2, C3) e IgG₁ (D1, D2, D3) em camundongos imunizados com vacina MSdT (—), ou controle (—, — e —) por via nasal (A1, B1, C1, D1), oral (A2, B2, C2, D2) e intraperitoneal (A3, B3, C3, D3). O reforço foi aplicado ao 14^o dia.

Figura 25. Relação entre os títulos de IgG₁ e IgG_{2a} antitetânicos (A, B, C) e antídiftéricos (D, E, F) para animais que receberam a vacina MSdT (—) e controle (—, — e —), por via intra peritoneal (A, D), nasal (B, E) e oral (C, F). Valores calculados a partir dos dados das figuras 23 e 24.

Considerando a resposta imunológica contra o tétano, por exemplo, pode ser evocada várias vezes durante a vida de um indivíduo, evitar um padrão de resposta do tipo T_H1 pode ser interessante, devido à resposta inflamatória desnecessária para a proteção (Lavigne *et al.*, 2004). **A formulação de MSdT mostra, de certo modo, um potencial para uma vacina de administração oral. Entretanto, outros estudos de avaliação de formulação e de dose devem ser realizados antes que se possa concluir a real eficácia de uma vacina dT encapsulada em PLGA por vias alternativas de administração.**

Comparação da MSdT com a vacina em gel de Al(OH)₃ em cobaias

O objetivo do experimento em cobaias, mais do que mostrar a eficácia da vacina encapsulada em um outro modelo animal, era avaliar a resposta de uma

dose subimunizante de anatoxinas em microesferas e o efeito da mistura de adjuvantes, isto é, até que ponto a sugestão do uso de uma sistema misto de microesferas de PLGA com gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ pode estimular adequadamente o sistema imunológico.

O experimento, descrito detalhadamente no item 22.3 de Materiais e Métodos consistiu da inoculação por via subcutânea de 0,75 mL de vacina em 6 cobaias por grupo. A cada 2 semanas os animais foram sangrados e os soros titulados por ToBI. Ao 112º dia os animais receberam 0,1 Lf de cada anatoxina por via subcutânea para se avaliar a capacidade de indução de resposta de memória para as formulações testadas. Cabe observar que, em decorrência da manipulação dos animais, após o reforço, os grupos ficaram reduzidos a 4 animais para o grupo MSdT e 3 animais para o grupo MSdT+gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$. Por isso, experimentos de desafio com toxina que tinham sido planejados foram cancelados.

Na figura 26 encontram-se os resultados para a titulação dos soros para as frações tetânica (26 A) e diftérica (26 B).

Para a fração tetânica, os animais que receberam MSdT tiveram uma resposta tímida ao 14º dia que caiu praticamente a zero, assim se mantendo (abaixo de 0,5 UI/mL) até o reforço, quando então a resposta ficou acima de 3,5 UI/mL e manteve-se acima de 6 UI/mL até o término do experimento. Aqueles animais que receberam a formulação de MSdT com dT adsorvida em gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ apresentaram títulos acima de 2 UI/mL já a partir do 28º dia, mantendo-se sempre acima desse valor. Após o reforço o título atingiu 60 UI/mL. Para o controle, o valor de 2 UI/mL foi atingido somente após o reforço.

Quanto à fração diftérica, os animais que receberam MSdT tiveram títulos sempre abaixo de 0,5 UI/mL, mesmo após o reforço. Os animais que receberam a formulação de MSdT com dT adsorvida em gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ apresentaram títulos sempre acima de 0,5 UI/mL, particularmente após o reforço, quando então atingiram valores da ordem de 3 UI/mL. Valor que se manteve sem queda estatisticamente significativa até o final do experimento. Já o controle teve títulos sempre abaixo de 0,1 UI/mL, mesmo após o reforço.

Figura 26. Cinética de formação de anticorpos antitetânicos (A) e antidiftéricos (B) em cobaias e determinados por ToBI (valores médios de cada grupo). Os animais receberam MSdT (●) e a formulação de MSdT com dT adsorvida em gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ (■). O grupo controle (■) recebeu apenas vacina dT em gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ à mesma concentração da formulação em teste. A seta indica a aplicação da dose de reforço. A linha tracejada indica o limite mínimo para aprovação do produto pelas normas da Farmacopéia Brasileira (2 UI/mL para fração tetânica e 0,5 UI/mL para fração diftérica).

O uso de gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ juntamente com microesferas é uma recomendação da OMS (Howard *et al.*, 1997). Alguns trabalhos já mostraram a eficácia deste sistema adjuvante misto (Singh *et al.*, 1997; Johansen *et al.*, 2000). O efeito favorável do gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ na mistura parece ser decorrente de seu estímulo seletivo à resposta T_H2 , além da possivelmente melhor dispersão das microesferas no gel, o que favoreceria a fagocitose das partículas pelas células imunocompetentes (Johansen *et al.*, 2000). Apesar da intenção de se usarem a microesferas em substituição ao gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ com a intenção de evitar seus efeitos secundários indesejáveis, o uso de 25% do total de alumínio de uma dose humana em uma vacina de dose única já é uma redução considerável na quantidade de alumínio administrado em um calendário de vacinação que contempla muitos antígenos.

Fato interessante foi a obtenção de títulos da ordem de 50 UI/mL para TTxd e de 3 UI/mL para DTxd utilizando a mistura de adjuvantes e uma dose baixa de antígenos. Ambos os controles (MSdT e vacina diluída em gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$) induziram respostas mais baixas do que os dois misturados. Isto indica não apenas uma sinergia dos sistemas adjuvantes, mas, sobretudo a sensibilização do sistema imunológico. **Ou seja, semelhantemente ao mostrado nos outros experimentos *in vivo*, mesmo havendo degradação do antígeno como mostrado nos experimentos *in vitro*, o sistema MSdT com dose baixa de antígeno e sem estabilizantes de proteínas foi capaz de produzir uma formulação imunogênica, superior à vacina em gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$, além de duradoura. Aqui, como nos experimentos anteriores, interações entre as proteínas encapsuladas e a resposta imunológica não pode ser avaliada, uma vez que os antígenos não foram testados separadamente.**

Como efeito comparativo, a média do resultado de atividade imunogênica determinada no Serviço de Controle de Qualidade do Instituto Butantan de 10 lotes de 2003/2004 de vacina dT foi de 6 UI/mL para fração tetânica e de 2 UI/mL para fração diftérica (Josefina Farina Moraes, comunicação pessoal). Deve-se notar que estes valores foram obtidos para sangrias realizadas no 42º e no 28º dia de imunização, respectivamente, momentos em que as vacinas experimentais apresentaram induziram os títulos na tabela 10.

Tabela 10. Título de anticorpos ao 42º dia (fração tetânica) e ao 28º dia (fração diftérica) nos grupos experimentais.

Grupo	Título de anticorpos (UI/mL)	
	Fração tetânica	Fração diftérica
MSdT	0,10 ± 0,02	0,026 ± 0,004
$\text{Al}(\text{OH})_3$	0,51 ± 0,05	0,020 ± 0,003
MSdT+ $\text{Al}(\text{OH})_3$	17,2 ± 1,6	1,5 ± 0,2
Vacina dT convencional	6,0	2,0

Um ponto notável foi **memória imunológica observada, em especial para a fração tetânica, mostrando que há uma sensibilização contínua das**

células imunocompetentes e indicando uma liberação lenta e contínua do antígeno *in vivo*. Outro ponto a ser considerado foi o ganho de peso constante das cobaias e o seu aspecto saudável durante todo o período do experimento, confirmando, como anteriormente, a ausência de reações tóxicas induzidas pela vacina.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

O objetivo deste trabalho era estudar condições e parâmetros para o preparo de uma vacina bivalente contra difteria e tétano encapsulada em microesferas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA).

Dentre as várias formulações adjuvantes desenvolvidas nos últimos anos, o PLGA tem se destacado como um dos mais promissores para o desenvolvimento de vacinas de dose única. Em uso há anos como material para o preparo de suturas e próteses, o PLGA tem um perfil de toxicidade, segurança e caracterização já muito bem definido.

Adotando como modelo a vacina dupla de uso adulto, isto é vacina bivalente contra difteria e tétano contendo as anatoxinas a 4 Lf/mL e a 10Lf/mL, respectivamente, realizaram-se estudos de encapsulação e de caracterização da formulação em microesferas de PLGA.

Embora com taxas de encapsulação relativamente elevadas, em proteína total acima de 80%, mostrou-se que há uma redução considerável na atividade antigênica de ambas as proteínas após o encapsulação. Decorrente de efeitos físico-químicos complexos, tal degradação pode ser reduzida com o uso de protetores descritos na literatura, aumentando as variáveis e a complexidade do sistema.

Mesmo com uma degradação dos antígenos, detectada por métodos como CD, fluorescência, HPLC em coluna de exclusão e marcada por alterações conformacionais e agregação, a formulação foi capaz de induzir uma resposta imunológica específica e protetora em camundongos, mais intensa do que aquelas obtidas para os controles de vacina livre e de vacina em gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$. Em cobaias a sinergia do efeito adjuvante das microesferas com o gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ permitiu que se obtivessem respostas imunológicas intensas e duradouras contra ambas as frações com uma dose baixa dos antígenos. Além disso, os experimentos *in vivo* demonstraram que o produto não apresenta reações tóxicas.

O objetivo da vacinação em geral é a **indução de memória protetora**, isto é, a capacidade do organismo responder adequadamente a uma infecção por um determinado patógeno contra o qual foi vacinado. Porém, os estudos com

vacinas freqüentemente focalizam a persistência da resposta imunológica e não a verdadeira indução de memória, isto é, a habilidade de re-estimular as células em repouso pela re-exposição ao antígeno. Assim, um sistema de liberação controlada, tal qual o apresentado nesta tese, mostra sua eficiência, induzindo memória imunológica e respostas efectoras protetoras, ao mesmo tempo em que não induz uma hiperimunização e a conseqüente supressão de resposta.

Outra característica importante das microesferas como veículo e adjuvante em vacinas é sua possibilidade de uso em outras vias de inoculação como nasal e oral. Mostrou-se em camundongos que a formulação MSdT foi capaz de induzir a formação de anticorpos não apenas por via intraperitoneal, mas também pelas vias nasal e oral, com indução de IgA e de memória.

Algumas questões referentes à encapsulação de vacina dT em microesferas de PLGA demandam, todavia, um estudo mais detalhado:

! qual a viabilidade no uso de outra proteína, ou algum outro estabilizador na formulação para a manutenção da atividade antigênica das anatoxinas.

! a determinação de IgA sérico, dá apenas uma indicação do desenvolvimento de uma resposta de mucosa. Outros testes em animais são necessários para avaliar a extensão da capacidade da formulação em estimular a resposta de mucosa.

Apesar das questões pendentes, os dados aqui apresentados mostram que o microencapsulação de vacina dT, isto é, de anatoxinas tetânica e diftérica, sem o uso de estabilizadores permitiu a produção de uma formulação vacinal viável, do ponto de vista imunológico podendo, inclusive, ser estendida a outros antígenos produzidos pelo Instituto Butantan, com ganhos consideráveis na redução no número de doses e na eficiência.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAOUÏ-ATTARKI, K.; PECQUET, S.; FATTAL, E.; TROLLE, S.; CHACHATY, E.; COUVREUR, P.; ANDREMONT, A. Protective immunity against *Salmonella typhimurium* elicited in mice by oral vaccination with phosphorylcholine encapsulated in poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Infection Immunity*, v.65, n.3, p.853-857, 1997.

CAHILL, E.S.; O'HAGAN, D.T.; ILLUM, L.; BARNARD, A.; MILLS, K.H.G.; REDHEAD, K. Immune responses and protection against *Bordetella pertussis* infection after intranasal immunization of mice with filamentous haemagglutinin in solution or incorporated in biodegradable microparticles. *Vaccine*, v.13, p.455-462, 1995.

CHANG, A.-C.; GUPTA, R.K. Stabilization of tetanus toxoid in poly(DL-lactic-co-glycolic acid) microspheres for the controlled release of antigen. *Journal of Pharmaceutical Science* v.85, p.129-132, 1996.

CLELAND, J.L. Design and production of single immunization vaccines using polylactide polyglycolide microspheres systems. In: POWELL, M.F.; NEWMAN, M.J., eds. Vaccine design: the subunit and adjuvant approach, New York: Plenum Press, 1995.

CONWAY, M.A.; MADRIGAL-ESTEBAS, L.; MCCLEAN, S.; BRAYDEN, D.J.; MILLS, K.H. Protection against *Bordetella pertussis* infection following parenteral or oral immunization with antigens entrapped in biodegradable particles: effect of formulation and route of immunization on induction of Th1 and Th2 cells. *Vaccine*, v.19, n.15/16, p.1940-1950, 2001.

COSTA, M.H.B.; FATTAL, E. Comparative study of the systemic immune response against a heat shock protein associated to different delivery systems. In:

CRS 27th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, 2000, Paris. *J. Control. Rel.*, p. 6407, 2000.

COSTA, M.H.B.; QUINTILIO, W.; TANIZAKI, M.M.; SANT'ANNA, O.A.; SCHWENDENER, R.A.; DE ARAUJO, P.S. Heat Shock Protein Micro-encapsulation as a Double Tool for the Improvement of new Generation Vaccines. *Journal of Liposome Research*, v.12, n.1/2, p. 29-35, 2002.

COSTA, M.H.B.; SANT'ANNA, O.A.; SATO, R.A.; BARRATT, G.; FATTAL, E. Antibody response and T-epitope conformational analysis of a heat shock protein encapsulated within PLGA microspheres. In: 2nd World Meeting Apgi Apv, Paris, 1998, **Proceedings**, p. 518-519.

COSTA, M.H.B.; TSURUTA, L.R.; QUINTILIO, W.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between cationic liposomes and an antigenic protein: the physical chemistry of the immunoadjuvant action. *Journal of Lipid Research* v.38, p.20-28, 1997.

COUVREUR, P.; BLANCO-PRIETO, M.J.; PUISIEUX, F.; ROQUES, B.; FATTAL, E. Multiple emulsion technology for the design of microspheres containing peptides and oligopeptides. *Advances in Drug Delivery Reviews*, v.28, p.85-96, 1997.

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

CVE - São Paulo (Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo). Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/>. Acesso em 30 janeiro 2005.

EDELMAN, E.R.; LANGER, R. Optimization of release from magnetically controlled polymeric drug release devices. *Biomaterials*, v.14, n.8, p.621-626, 1993.

EDELMAN, R. An overview of adjuvant use. In: O'HAGAN, D.T., ed. *Methods in Molecular Medicine*, 42: Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research protocols, Totowa: Humana Press Inc., 2002.

ESPARZA, I.; KISSEL, T. Parameters affecting the immunogenicity of microencapsulated tetanus toxoid. *Vaccine*, v.10, p.714-720, 1992.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4. ed. São Paulo: Atheneu. 2001, n. 2.

FATTAL, E. Applications des systèmes particuliers à la formulation des vaccins, 2003. Disponível em: <http://h0.web.u-psud.fr/umr-cnrs8612/DEA/documents/RoneoVaccins.doc>. Acesso em 25 fevereiro 2005.

FUNASA, Fundação Nacional de Saúde, Situação das Doenças transmissíveis no Brasil, setembro , 2002.

FURR, B.J.A.; HUTCHINSON, F.G. A biodegradable delivery system for peptides: preclinical experience with the gonadotrophin-releasing hormone agonist Zoladex®, *Journal of Controlled Release*, v. 21, n. 1/3, p.117-127.

GALAZCA, A. Les bases immunologiques de la vaccination. Module 3 : La diftérie, WHO/EPI/GEN/93.12, 1993a.

GALAZCA, A. Les bases immunologiques de la vaccination. Module 3 : Le tétanos, WHO/EPI/GEN/93.13, 1993b.

GALAZKA, A.; MILSTIEN, J.; ZAFFRAN, M. *Thermostabilité des vaccins*. WHO/GPV/98.07. Organização Mundial da Saúde, Genebra, 1998.

GOODMAN, M.G. A new approach to Vaccine Adjuvants. In: POWELL, M.F.; NEWMAN, M.J., eds. *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Plenum Press, p. 581-609, 1995.

GÖPFERICH, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*, v.17, p.103-114, 1996.

GREGORIADIS, G.; WANG, Z.; BARENHOLZ, Y.; FRANCIS, M.J. Liposome-entrapped T-cell peptide provides help for a co-entrapped B-cell peptide to overcome genetic restriction in mice and induce immunological memory. *Immunology*, v.80, p.535-540, 1993.

GUPTA, R.K.; RELYVELD, E.H.; LINDBLAD, E.B.; BIZZINI, B.; BEN-EFRAIN, S.; GUPTA, C.K. Adjuvants – a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine*, v.11, n.3, p.293-306, 1993.

GUPTA, R.K.; CHANG, A-C.; GRIFFIN, P.; RIVERA, R; GUO, Y.-Y.; SIBER, G.R. Determination of protein loading in biodegradable polymer microspheres containing tetanus toxoid. *Vaccine*, v.15, n.6/7, p. 672-678, 1997.

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

HELLER, J. Modulated release from drug delivery devices. *Critical Rev Ther Drug Carrier Systems*, v.10, n.3, p.253-305, 1993.

HOWARD, C.R.; BEALE, AL.; AGUADO, MT. The development of controlled release vaccines – The role of the World Health Organisation. In: GANDER, B; MERKLE, H.P.; CORRADIN G., eds. *Antigen delivery systems*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 1-14, 1997.

JAGANATHAN, K.S.; RAO, Y.U.B.; SINGH, P.; PRABAKARAN, D.; GUPTA, S.; JAIN, A.; VYAS, S.P. Development of a single dose tetanus toxoid formulation based on polymeric microspheres: a comparative study of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) versus chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, v.294, p.23-32, 2005.

JEFFERY, H.; DAVIS, S.S.; O'HAGAN, D.T. The preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. II. The entrapment of a model protein using a (water-in-oil-in-water) emulsion solvent evaporation technique. *Phar. Res.*, v.10, p.362-368, 1993.

JIANG, W.; GUPTA, R.K.; DESHPANDE, M.C.; SCHWENDEMAN, S.P. Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Advances in Drug Delivery Reviews*, v.57, n.3, p.391-410, 2005.

JOHANSEN, P.; CORRADIN, G.; MERKLE, H.P.; GANDER, B. Release of tetanus toxoid from adjuvants and PLGA microspheres: how experimental set-up and surface adsorption fool the pattern *Journal of Controlled Release*, v.56, n.1/3, p.209-217, 1998.

JOHANSEN, P.; MOON, L.; TAMBER, H.; MERKLE, H.P.; GANDER, B.; SESARDIC, D. Immunogenicity of single-dose diphtheria vaccines based on PLA/PLGA microspheres in guinea pigs. *Vaccine*, v.18, n.3, p.209-215, 1999.

JOHANSEN, P.; ESTEVEZ, F.; CORRADIN, G.; ZURBRIGGEN, R.; GLÜCK, R.; AGUADO, M.T.; MERKLE, H.P.; GANDER, B. Final pre-clinical testing of a single-injection tetanus vaccine based on biodegradable microspheres in guinea pigs. *International Controlled Release and Bioactive Materials*, Controlled Release Society, Inc. **Proceedings**, #0222, 2000.

JONES, D.L.; MACBRIDE, B.W.; FARRAR, G.H. Poly(lactide-co-glycolide) microencapsulation of vaccine antigens. *Journal of Biotechnology*, v.44, p.29-36, 1996.

KERSTEN, G.F.; DONDERS, D.; AKKERMANS, A.; BEUVERY, E.C. Single shot with tetanus toxoid in biodegradable microspheres protects mice despite acid-induced denaturation of the antigen. *Vaccine*, v.14, n.17/18, p.1627-1632, 1996.

LAVIGNE, M.V.; CASTRO, M.; ANDINO, J.; MANGHI, M. Alternative diphtheria, tetanus and whooping cough immunization schedule to evoke a Th2 tetanus and a Th1 pertussis immune response. *Microbes and Infection*, v.6, n.5, p.481-484, 2004.

LOFTHOUSE, S. Immunological aspects of controlled antigen delivery. *Advances in Drug Delivery Reviews*, v.54, n.6, p.863-870, 2002.

MARCOVISTZ, R.; MATOS, D.C.; GEORGINI, R.A.; SAKAUCHI, D. Potency control of diphtheria component in adsorbed vaccines by in vitro neutralization tests. *Biologicals*, v.30, n.2, p.105-112, 2002.

MCGINITY, J.W.; O'DONNELL, P.B. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Advances in Drug Delivery Reviews*, v.28, n.1, p.25-42, 1997.

NAMUR, J.A.; TAKATA, C.S.; MORO, A.M.; POLITI, M.J.; DE ARAUJO, P.S.; CUCCOVIA, I.M.; DA COSTA, M.H. Lactic acid triggers, in vitro, thiomersal to degrade protein in the presence of PLGA microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, v.273, n.1/2, p.1-8, 2004.

PALIWAL, R.; LONDON, E. Comparison of the conformation, hydrophobicity, and model membrane interactions of diphtheria toxin to those of formaldehyde-treated toxin (diphtheria toxoid): formaldehyde stabilization of the native conformation

inhibits changes that allow membrane insertion. *Biochemistry*, v.35, n.7, p.2374-2379, 1996.

PETERSON, GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, v.83, p.346-356, 1977.

PEYRE, M.; SESARDIC, D.; MERKLE, H.P.; GANDER, B.; JOHANSEN, P. An experimental divalent vaccine based on biodegradable microspheres induces protective immunity against tetanus and diphtheria. *J Pharm Sci.*, v.92, n.5, p.957-966, 2003.

PREIS, I.; LANGER, R.S. A single-step immunization by sustained antigen release. *Journal of Immunology Methods*, v.8, n.1/2, p.193-197, 1979.

PRETZKE, M. Mucosal immunology and Vaccine development, 2000. disponível em: http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/handouts/feb23.pdf. Acesso em 20 março 2005.

PUBMED - National Library of Medicine – National Institute of Health. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>. Acesso em: 15 fevereiro 2005.

QUINTILIO, W.; SATO, R.A.; SANT'ANNA, O.A.; ESTEVES, M.I.; SESSO, A.; DE ARAUJO, P.S.; BUENO DA COSTA, M.H. Large unilamellar vesicles as trehalose-stabilised vehicles for vaccines: storage time and *in vivo* studies. *Journal of Controlled Release*, v.67, n.2/3, p.409-413, 2000.

RAGHUVANSHI, R.J.; MISTRA, A.; TALWAR, G.P.; LEVY, R.J.; LABHASETWAR, V. Enhanced immune response with a combination of alum and biodegradable nanoparticles containing tetanus toxoid. *Journal of Microencapsulation*, v.18, n.6, p.723-732, 2001.

RAMON, G. Sur la toxine et anatoxine diftériques. *Annales de l'Institut Pasteur*, v.38, p. 1, 1924.

RAPPUOLI, R. New and Improved vaccines Against Diphtheria and Tetanus. In: LEVINE, M.M.; WOODROW, G.C.; KAPER, J.B., eds. *New generation vaccines*, Marcel Dekker, Inc., p.417-436, 1997.

ROSAS, J.E.; PEDRAZ, J.L.; HERNANDEZ, R.M.; GASCON, A.R.; IGARTUA, M.; GUZMAN, F.; RODRIGUEZ, R.; CORTES, J.; PATARROYO, M.E. Remarkably high antibody levels and protection against *P. falciparum* malaria in Aotus monkeys after a single immunisation of SPf66 encapsulated in PLGA microspheres. *Vaccine*, v.20, n.13, p.1707-1710, 2002.

SAH, H. Protein Behaviour at the Water/Methylene Chloride Interface. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.88, n.12, p.1320-1325, 1999.

SAH, H.K.; TODDYWALA, R.; CHIEN, Y.W. The influence of biodegradable microcapsule formulations on the controlled release of a protein. *Journal of Controlled Release*, v.30, p.201-211, 1994.

SANT'ANNA, O.A.; LIMA, F.A.; DE FRANCO, M.; RIBEIRO, O.G. Imunogenética e Resistência a Infecções. In: MIR, L.; RZEZINSKI, P., eds. *Genômica*. 1. ed. São Paulo, v. 1, p. -, 2004.

SCHIJNS, V.E.J.C. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Current Opinion in Immunology*, v.12, n.4, p.456-463, 2000.

SCHMID, F.X. Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. In: CREIGHTON, T.E., ed. *Protein Structure – a practical approach*, IRL Press, 1990.

SCHWENDEMAN, S.P.; COSTANTINO, H.R.; GUPTA, R.K.; SIBER, G.R.; KLIBANOV, A.M.; LANGER, R. Stabilization of tetanus and diphtheria toxoids against moisture-induced aggregation. *Proceedings of National Academy of Sciences*, v.92, p.11234-11238, 1995.

SHI, L.; CAULFIELD, M.J.; CHERN, R.T.; WILSON, R.A.; SANYAL, G.; VOLKIN, D.B. Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-shot hepatitis B vaccine formulated with PLGA microspheres. *Journal of Pharmaceutical Science*, v.91, n.4, p.1019-1035, 2002.

SINGH, M.; LI, X.M.; WANG, H.; MCGEE, J.P.; ZAMB, T.; KOFF, W.; WANG, C.Y.; O'HAGAN, D.T. Immunogenicity and protection in small-animal models with controlled-release tetanus toxoid microparticles as a single-dose vaccine. *Infection Immunity*, v.65, n.5, p.1716-1721, 1997.

SINGH, M.; O'HAGAN, D. Advances in vaccines adjuvants. *Nature Biotechnology*, v.17, p.1075-1081, 1999.

SOUZA-MATOS, D.C.; MARCOVISTZ, R.; CABELLO, P.H.; GEORGINI, R.A.; SAKAUCHI, D; DA SILVA, L.L. Immunogenicity test of tetanus component in adsorbed vaccines by toxin binding inhibition test. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.97, n.6, p.909-913, 2002.

TAMBER, H.; JOHANSEN, P.; MERKLE, H.P.; GANDER, B. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.57, n.3, p.357-376, 2005.

USPTO (2005) United States Patent and Trademark office. Disponível em: <http://www.uspto.gov>. Acesso em: 25 fevereiro 2005.

VAN DE WEERT, M.; HENNINK, W.E.; JISKOOT, W. Protein Instability in Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Microparticles. *Pharmaceutical Research*, v.17, n.10, p.1159-1160, 2000.

VANDERVOORT, J.; LUDWIG, A. Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study. *Int. J. Pharm.*, v.238, p.77-92, 2002.

WAECKERLE-MEN, Y.; GROETTRUP, M. PLGA microspheres for improved antigen delivery to dendritic cells as cellular vaccines. *Advances in Drug Delivery Reviews*, v.57, n.3, p.475-482, 2005.

WHITE, J.L.; HEM, S.L. Characterization of Aluminium-Containing Adjuvants. In: CORBEL, B.F.; GRIFFITHS, E., eds. Physico-Chemical Procedures for the Characterization of Vaccines. *Developments on Biological Standardization*, v.103, p.217-228, 2000.

WHO, Manual for the Production and Control of Vaccines - Tetanus toxoid, BLG/UNDP/77.2 Rev. 1, 1977.

XING, D.K.L.; MCLELLAN, K.; CORBEL, M.J.; SESARDIC, D. Estimation of antigenic tetanus toxoid extracted from biodegradable microspheres. *Biologicals*, v.24, p.57-65, 1996.

YEH, M.K.; COOMBES, A.G.; CHEN, J.L.; CHIANG, C.H. Japanese encephalitis virus vaccine formulations using PLA lamellar and PLG microparticles. *Journal of Microencapsulation*, v.19, n.5, p.671-682, 2002.

ZHU, G.; SCHWENDEMAN, S.P. Stabilization of proteins encapsulated in cylindrical poly(lactide-co-glycolide) implants: mechanism of stabilization by basic additives. *Pharm Research*, v.17, n.3, p.351-357, 2000.

6. ANEXO

Percentuais relativos dos picos de eluição por HPLC dos sobrenadantes das microesferas

Observação: ND = não detectado/ abaixo do limite de detecção.

Tabela 11. Cinética de liberação *in vitro* das anatoxinas encapsuladas.

	Tr (min)	Tempo (semanas)							
		Típico	0	1	2	3	4	5	6
DTxd	TTxd	6,0	0,93	ND	ND	0,4	ND	ND	ND
	Dímero	4,4	0,2	0,04	0,5	0,3	0,8	0,2	0,15
	Monômero	7,0	1,03	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	A	10,3	0,09	10,0	8,7	10,0	24,5	8,6	16,7
	B	9,8	0,07	5,1	5,6	7,0	0,2	0,2	21,2
	Timerosal	11,0	97,7	84,9	85,2	82,3	74,5	91,0	62,1
	Espécies com Tr maior do que 11 min		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tabela 12. Efeito dos produtos da degradação da matriz polimérica sobre a estabilidade das proteínas encapsuladas.

		Tr (min)	Tempo (semanas)					
			0	1	2	3	4	5
DTxd	TTxd	6,0	1,9	1,0	0,91	1,03	0,7	1,4
	Dímero	4,4	0,11	0,1	ND	ND	0,4	0,1
	Monômero	7,0	0,4	0,2	ND	0,03	ND	0,3
	A	10,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	B	9,8	ND	0,5	1,1	2,5	2,1	3,0
	Timerosal	11,0	97,6	98,2	98,0	96,4	96,8	95,2
	Espécies com Tr maior do que 11 min		ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tabela 13. Cinética de liberação *in vitro* das anatoxinas encapsuladas – ensaio cumulativo. (A) MSdT.

		Tr (min)	Tempo (dias)										
			0	7	14	21	29	35	43	50	64	92	120
DTxd	TTxd	6,0	0,03	0,4	0,05	0,01	0,01	0,01	ND	ND	0,02	ND	ND
	Dímero	4,4	ND	ND	0,02	0,01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Monômero	7,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	A	10,3	1,5	2,5	3,0	2,1	3,0	2,5	1,0	1,5	0,6	0,9	12
	B	9,8	0,05	0,03	0,01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Timerosal	11,0	98,4	96,6	92,8	93,8	95,0	95,3	94,0	74,4	76,1	78,0	98,8
Espécies com Tr maior do que 11 min			ND	0,5	3,8	4,1	2,0	2,2	5,0	0,8	25,0	23,0	10,0

[illegible]