

**Publicação**

Expediente
Bibliografia
Gráficos

Maio, 2004 Ano 1 Número 5

[retorna](#)

Vacina Nasal para *Neisseria meningitidis* B: Importância das Pesquisas Utilizando Novas Metodologias para o Preparo de Vacinas

DownLoad

Edição nº 5
Edição nº 4
Edição nº 3
Edição nº 2
Edição nº 1

Na última década, os avanços tecnológicos de desenvolvimento de vacinas permitiram a introdução de novas estratégias para a obtenção e produção de antígenos, assim como foram otimizadas novas maneiras de se administrar e apresentar esses antígenos para as células do sistema imune. Estas estratégias abriram caminhos para inovações, particularmente no contexto de vacinas mais seguras, eficazes e polivalentes. Entre estas estão as de subunidades, consideradas de segunda geração, constituídas de antígenos purificados e provenientes de fontes naturais, sintéticas, nas quais os genes ou fragmentos de genes, que codificam antígenos altamente imunogênicos, são carregados por plasmídeos de DNA.

Atualmente, o isolamento de genes é uma técnica dominada pela ciência devido ao desenvolvimento da biologia molecular. Os benefícios práticos e estratégicos resultantes do desenvolvimento de vacinas gênicas são inúmeros, e absolutamente desejáveis no âmbito da realidade brasileira. O impacto sobre o controle das doenças infecciosas que podem ser prevenidas por imunização gênica será, provavelmente, uma das aquisições mais importantes advindas do domínio desta nova tecnologia.

Dentre os desenvolvimentos promissores para o futuro, incluem-se o melhoramento e a criação de novas vacinas, novas terapias específicas e novas estratégias para controlar as doenças infecciosas. Dada à habilidade dos agentes infecciosos no envolvimento das doenças, faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas de identificação e controle das doenças re-emergentes.

Sistema imune de mucosa

O sistema imune de mucosas consiste de moléculas, células e estruturas linfóides organizadas, que conferem a imunidade contra patógenos que agredem as superfícies de mucosas. A infecção de mucosa por patógenos intracelulares resultam da indução da imunidade mediada por células CD4+T-helper 1, bem como linfócitos CD8+T-citotóxico. Estas respostas são, normalmente, acompanhadas pela síntese de imunoglobulinas A secretória (S-IgA) anticorpos, que representa a primeira linha de defesa contra a invasão de patógenos nos tecidos de mucosas.

As superfícies de mucosa são predominantes nos tratos gastrointestinal, urogenital e trato respiratório, que atuam como uma porta de entrada para os patógenos.

Anticorpos monoclonais

Já se passaram 29 anos desde que Milstein e Kohler, em 1975, pela primeira vez

descreveram a obtenção de anticorpos monoclonais, fato que revolucionou muito a pesquisa em imunologia. Desde então, a utilização de tais moléculas tem se difundido nos mais variados campos, seja na pesquisa básica ou em estudos clínicos (figura 1). A produção de anticorpos monoclonais permitiu caracterizar antígenos importantes, responsáveis pela produção de anticorpos capazes de destruir a bactéria *N. meningitidis* B. Foi possível por meio da utilização destes anticorpos, recentemente caracterizar novos antígenos vacinais (11,12,14) tão bem como utilizar em estudos epidemiológicos (15,17). Nas figuras 2 e 3 podemos observar a prevalência dos imunotipos (LPS) em cepas de diferentes sorogrupos de *N. meningitidis*, durante epidemias ocorridas no Brasil.

Figura 1 — Esquema ilustrativo para a obtenção de Anticorpos monoclonais em camundongos. **Antígeno:** Membrana externa de *Neisseria meningitidis* B utilizado para imunização de camundongos; **Esplenócito:** linfócitos retirados do baço dos camundongos (capacidade de produzir anticorpos). **Mieloma** células com grande capacidade de multiplicação. Os linfócitos e as células de mieloma são combinadas no laboratório. Vão originar uma célula com capacidade de produzir anticorpos em grande quantidade (hibridoma). A célula híbrida após diferentes procedimentos produzirá o anticorpo monoclonal.



Figura 2 — Estudo comparativo da reatividade por meio de *Dot-Elisa* de Anticorpos monoclonais (AcMs) para os imunotipos (LPS). L1(1) e L1(2), e L8(1) e L8(2) com cepas de *N. meningitidis*, isoladas durante epidemias no Brasil. (A): cepas *N. meningitidis* do sorogrupo A, (B): cepas *N. meningitidis* do sorogrupo B, (C): cepas *N. meningitidis* do sorogrupo C. (1) AcMs obtido, (2) AcMs de referência.

(Thomaz Belo, 2002).

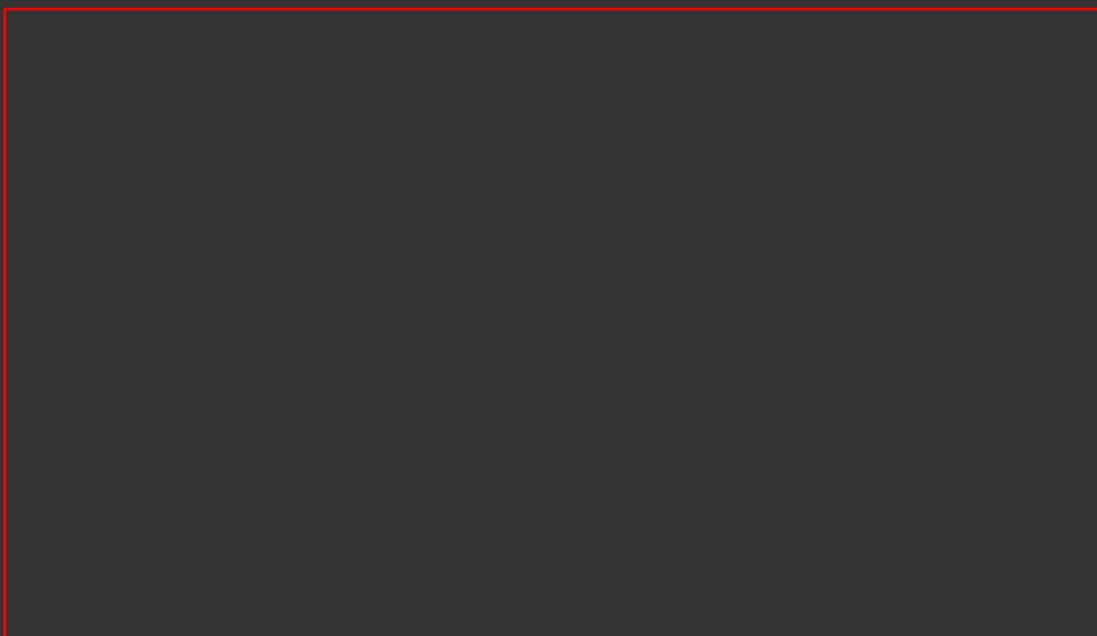
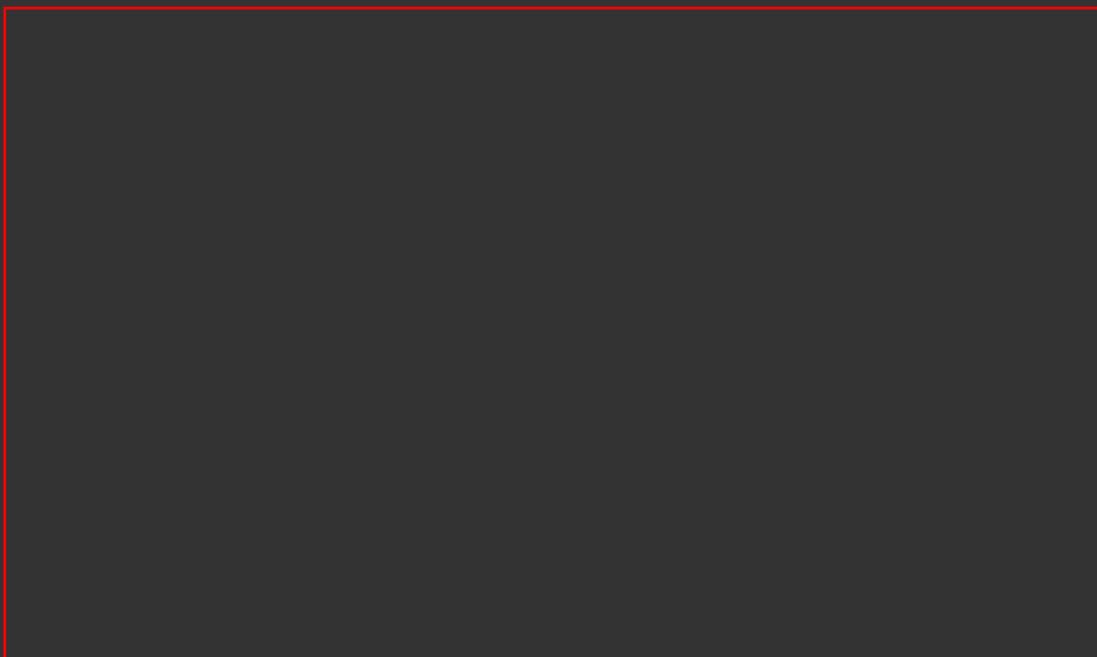


Figura 3 — Estudo comparativo da reatividade por meio de *Dot-Elisa* dos Anticorpos monoclonais L_{3,7,9} e L₁₀ com cepas de *N. meningitidis*, isoladas durante epidemias no Brasil. (A) cepas *N. meningitidis* do sorogrupo A, (B) cepas *N. meningitidis* sorogrupo B, (C) cepas *N. meningitidis* do sorogrupo C. (1) AcM 4BE12-C10 (L₃₇₉) e (2) AcM 5B4: F10 (L₁₀). (Thomaz Belo, 2002).



Neisseria meningitidis

Apesar do avanço tecnológico, a doença meningocócica continua sendo um grande problema

de saúde pública em todos os continentes. A dificuldade para se chegar a uma vacina definitiva pode ser atribuída à grande capacidade que a bactéria tem de escapar dos mecanismos de defesa do sistema imune, além da falta de um modelo experimental que permita estudar a infecção meningocócica.

O conhecimento de componentes antigênicos do microrganismo é de suma importância para estudo da resposta imune, contribuindo para a idealização de novas vacinas.

Vacinas estudadas

Os mais recentes estudos de campo com o objetivo de avaliar a eficácia das vacinas contra a meningite causada por *N. meningitidis* B foram realizados no Chile, Cuba, Noruega e Brasil.

As pesquisas de uma vacina nasal para *Neisseria meningitidis* B – 1999 a 2004 – Instituto Adolfo Lutz (Seção de Imunologia)

O meningococo pode ser encontrado na nasofaringe desde a infância, especialmente em crianças menores de 4 anos de idade. Isto provavelmente está relacionado com a alta incidência da doença, principalmente atribuída a uma insuficiente imunidade natural. O intermitente estado de carreador com diferentes cepas de meningococos resulta no desenvolvimento de uma imunidade natural contra a infecção meningocócica, que aumenta com a idade (1).

O novo esquema de imunização utilizando a via nasal está sendo estudado por diferentes grupos de pesquisadores no mundo (2-7). Nossa pesquisa utilizando a via de imunização nasal e novas preparações vacinais pretende contribuir com um novo esquema de imunização para o preparo de uma vacina efetiva e segura contra a bactéria *N. meningitidis* B (8-25) no Brasil. Nosso laboratório foi o pioneiro nos estudos utilizando a via nasal para imunização contra *N. meningitidis* B.

Sabemos que as vacinas existentes administradas pela via parenteral são sorotipos específicos, isto é, a proteção produzida é para cepas prevalentes durante uma epidemia. O que podemos observar em nossos estudos em modelo experimental (16,18,19) é que a imunização nasal produz anticorpos que conseguem destruir mais de uma cepa de meningococo. Ou seja, a proteção induzida não é sorotipo específico.

No momento, também utilizamos camundongos neonatos, pois sabemos que mesmo as vacinas existentes não são efetivas para crianças menores de 2 anos de idade. A imunidade natural contra *N. meningitidis* é adquirida durante a infância por colonizações sucessivas através de cepas de carreadores de *N. meningitidis* ou outro gênero de bactérias que compartilham antígenos comuns.

Estudos estão sendo realizados com a bactéria *Neisseria lactamica* (20,21) ou utilizando combinações vacinais, como a *Bordetella pertussis*, administrada pela via nasal (22), na tentativa de aumentar a imunogenicidade de nossas preparações vacinais. Nas figuras 4, 5 e 6 podemos observar camundongos, coelhos que são utilizados como modelos experimentais de novas preparações vacinais para *N. meningitidis* B. A estratégia de nossos estudos para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra meningococos do sorogrupo B utiliza anticorpos monoclonais para a identificação e caracterização de antígenos relevantes, principalmente os de reatividade cruzada (12,18).

Figura 4 — Imunização nasal em camundongos utilizando antígenos de membrana externa de *Neisseria meningitidis* B

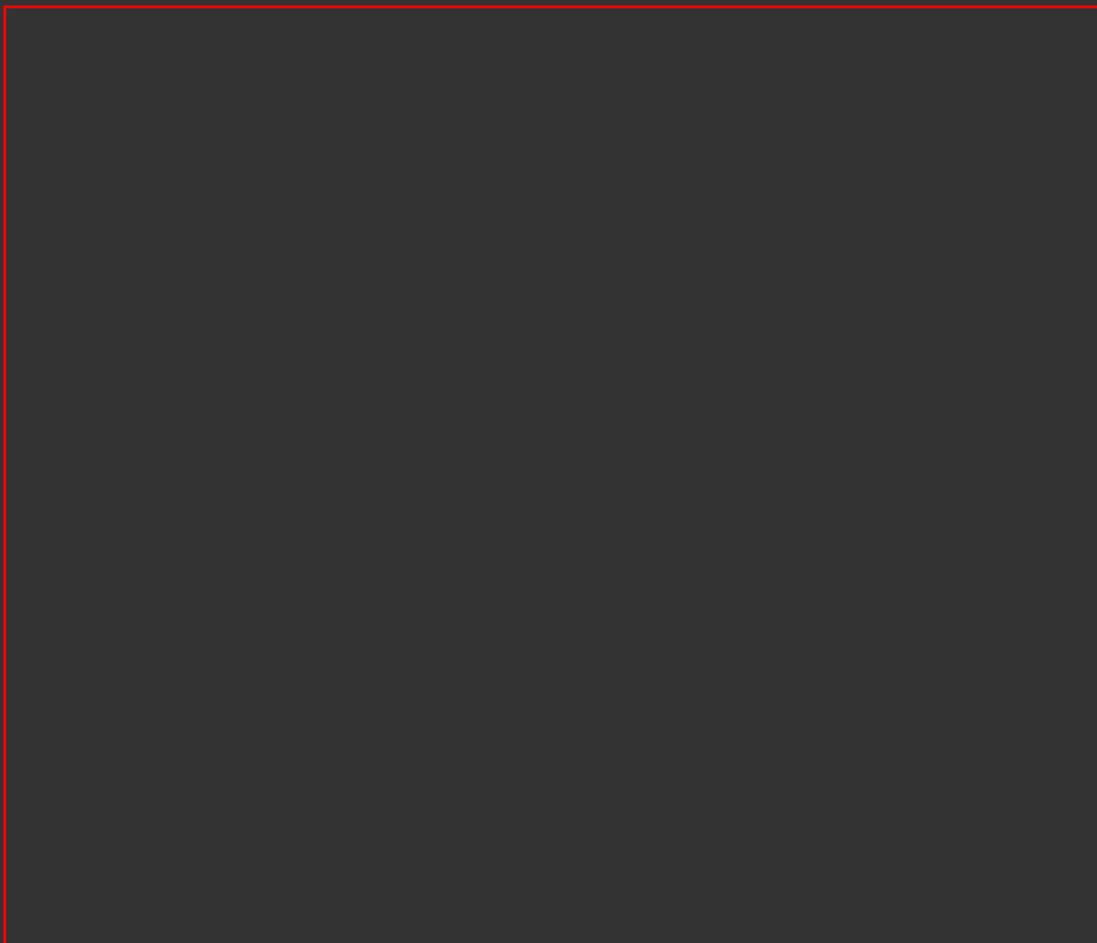


Figura 5 — Imunização nasal em coelhos com antígenos de membrana externa de *Neisseria meningitidis* B

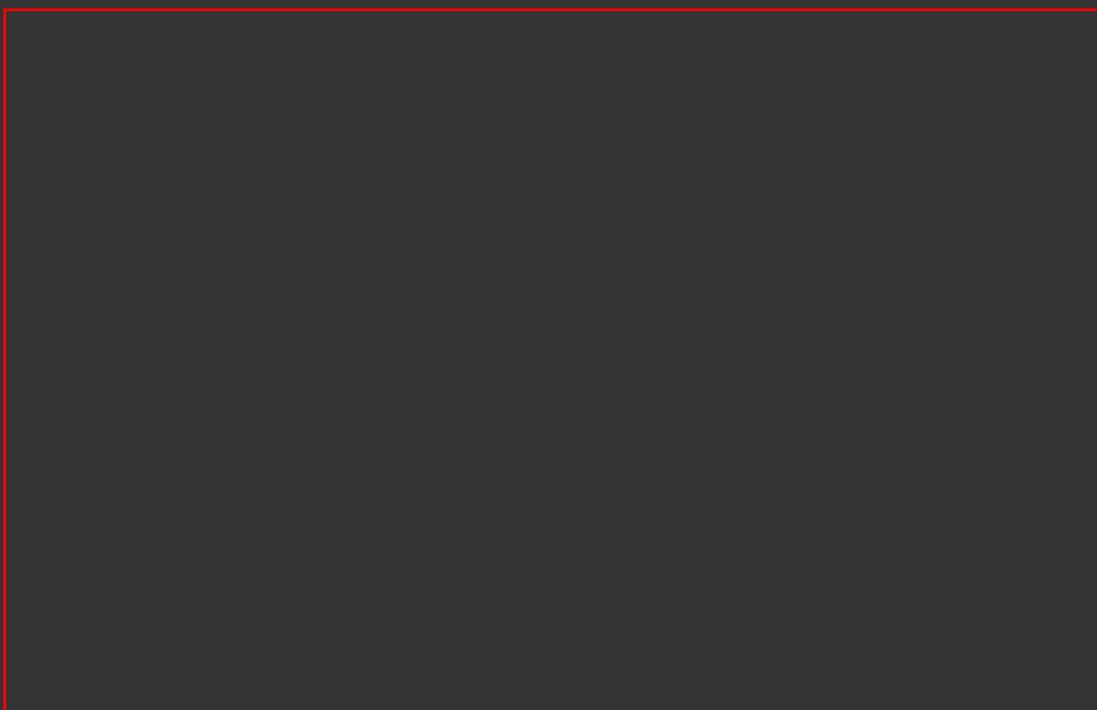


Figura 6 — Caracterização imunológica (-SDS-PAGE 13%) com antígeno de membrana externa de *N. meningitidis* da cepa B:4:P1.9 L_{3,7,9},L₈,L₁. (a) coloração por meio de Coomassie Blue; (b) coloração por meio de prata; (c) em 2 e 3 reatividade com os dois novos AcMs obtidos 1C₃1B₈B_{R4} (L₈) e 1B₈1C₃1B₈B_{R5} (L₁) e (1) Reatividade com o AcM de referência L_{3,7,9}. Peso molecular dos imunotipos - L₃₇₉ (5,9 kDa), L₁ (4,8 kDa) e L₈ (3,6 kDa). Antígeno utilizado na imunização nasal de camundongos e coelhos.



Há mais de 20 anos as vacinas contra *N. meningitidis* dos sorogrupos A e C foram desenvolvidas. Entretanto, mais estudos ainda são necessários. As formulações vacinais utilizadas no caso do sorogrupo B ainda não apresentaram a proteção esperada. Estudos recentes vêm utilizando preparações vacinais de *N. meningitidis* B administradas pela via nasal.

Temos a acrescentar que, tanto nos estudos realizados no mundo como em nossos estudos, uma proteção é desenvolvida. Porém, não podemos prever o tempo de conclusão dos mesmos. Testes em voluntários serão importantes para se avaliar se a vacina nasal terá sucesso para utilização em seres humanos. Nossos estudos utilizam novas preparações vacinais, e via nasal - Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, projetos de pesquisa com o intuito de contribuir na área do conhecimento. Se conseguirmos uma preparação vacinal efetiva para este patógeno, a passagem de tecnologia será feita para os grandes centros produtores de vacinas do País ou realizaremos projetos em parceria.

Conclusão

A descoberta de novas formulações vacinais para as principais doenças infecciosas que acometem a população mundial é de extrema relevância para a saúde pública. As novas técnicas de engenharia genética e biologia molecular desempenham um papel importante

nas novas descobertas, abrindo possibilidades para a criação de vacinas cada vez mais eficazes. A vacina para *N. meningitidis* B administrada pela via nasal vem sendo estudada há mais de cinco anos em nosso laboratório, com resultados promissores.

Os investimentos no controle de doenças meningocócica por meio da utilização de vacinas são compensadores, quando comparados com os gastos com o tratamento hospitalar, as conseqüências das seqüelas hospitalares permanentes, os gastos com quimioprofilaxia e outras medidas de custo eficiência. O desenvolvimento recente de uma nova geração de vacinas anti-meningocócica, composta por polissacarídeos (A,C,YW135 e Y), conjugada com proteínas, contribui com novas perspectivas para o controle de doença meningocócica. Entretanto, as vacinas conjugadas requerem 2 ou 3 doses, aplicadas com intervalos de pelo menos 1 mês, mas não induzem proteção em crianças menores de 2 anos.

Nossos estudos demonstram que não somente a atividade bactericida, mas também a atividade opsônica dos anticorpos induzidos pela vacinação deve ser considerada na análise da resposta imune contra *N. meningitidis* B. Para se estudar o efeito funcional de vacinas é necessário a utilização de modelos *in vivo* e *in vitro*, para que se possa correlacionar com a proteção.

Autora: De Gaspari, E.N, Pesquisador Científico VI, Seção de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz

Referências bibliográficas

1. Goldchneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the Meningococcus. II. Development of natural immunity J Exp Med 1969;129:1327.
2. Haneberg B, Dalseg R, Wedege E, Hoiby EA, Haugen IL, Oftung F, Andersen SR, Naess LM, Aase A, Michaelsen TE, Holst J. Intranasal administration of a meningococcal outer membrane vesicle vaccine induces persistent local mucosal antibodies and serum antibodies with strong bactericidal activity in humans. Infect Immun. 1998 ;66:1334.
3. Oftung F, Naess LM, Wetzler LM, Korsvold GE, Aase A, Hoiby EA, Dalseg R, Holst J, Michaelsen TE, Haneberg B. Antigen-specific T-cell responses in humans after intranasal immunization with a meningococcal serogroup B outer membrane vesicle vaccine. Infect Immun. 1999 67:921.
4. Saunders NB, Shoemaker DR, Brandt BL, Moran EE, Larsen T, Zollinger WD. Immunogenicity of intranasally administered meningococcal native outer membrane vesicles in mice. Infect Immun. 1999 ;67:113.
5. Drabick JJ, Brandt BL, Moran EE, Saunders NB, Shoemaker DR, Zollinger WD. Safety and immunogenicity testing of an intranasal group B meningococcal native outer membrane vesicle vaccine in healthy volunteers. Vaccine. 1999;18 :160.
6. Katial RK, Brandt BL, Moran EE, Marks S, Agnello V, Zollinger WD. Immunogenicity and safety testing of a group B intranasal meningococcal native outer membrane vesicle vaccine. Infect Immun. 2002; 70:702.
7. Guthrie T, Wong SY, Liang B, Hyland L, Hou S, Hoiby EA, Andersen SR. Local and systemic antibody responses in mice immunized intranasally with native and detergent-

extracted outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. Infect Immun. 2004 ;72:2528.

8. De Gaspari EN. Em busca de uma vacina nasal contra a meningite . Revista de Pesquisa FAPESP 1998 : 36:10.

9. De Gaspari EN Vacina nasal contra meningite . Ciência Hoje 1998:151.

10. De Gaspari, E.N., Ribeiro, A.A., Baccocini, C.N., Zollinger, W.D. The use of filter paper monoclonal antibodies in a Dot-blot test for typing *Neisseria meningitidis* B. Braz. J. Med. Biol. Res. 1994;27:2889.

11. De Gaspari, E.N. A new monoclonal antibody against outer membrane complex (50KD) of *Neisseria meningitidis* modify the course of bacteremia in a mouse model. An. Acad. Bras. Cienc 1995; 96:63.

12. De Gaspari, E.N. Production and characterization of a new monoclonal antibody against *Neisseria meningitidis*: study of the cross-reactivity with different bacterial genera. Hybridoma 2000; 19 :445.

13. De Gaspari, E.N. Uma visão retrospectiva das principais vacinas para *Neisseria meningitidis* B. LAES HAES 2000; 122:130.

14. De Gaspari, E.N., Zollinger , W. Expression of class 5 antigens by meningococcal strains obtained from patients in Brazil and evaluation of two new monoclonal antibodies. Braz. J. Infect. Dis. 2001; 5:143.

15. Belo, EFT., De Gaspari, EN. Produção e caracterização de dois novos anticorpos monoclonais para imunotipos de LPS importantes na seleção de cepas para o preparo de vacinas de *N. meningitidis* B. Rev. Inst. Adolfo Lutz 2001;60.

16. Coutinho, LMCC. Uso de anticorpos monoclonais na seleção de antígenos lipopolissacáride da cepa epidêmica de B:4:P1.15 de *Neisseria meningitidis*: Imunização intranasal. São Paulo, 2002. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo).

17. Thomaz Belo ,EF. Expressão antigênica de LPS das cepas meningocócicas prevalentes no Brasil, produção de anticorpos monoclonais como subsídios para estudos epidemiológicos ,2002. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo).

18. De Gaspari ,EN. Identification of a novel membrane protein of *Neisseria meningitidis* and its potential as a vaccine candidate. Immunol Lett 1999;69.

19. Seneme Ferraz A, Coutinho LMC, Thomaz Belo EF, Oliveira, APS, De Gaspari, EN. Immunogenicity of a highly conserved *Neisseria meningitidis* surface protein in rabbit after nasal immunization with native outer membrane vesicles Eur.J.Pharm.Sci 2000; 13:91.

20.. Tunes CF , Thomaz Belo, EF, Coutinho, LMCC , Ferraz AS ,Carmo AMS, Ito AY, Néri SV , De Gaspari,EN. Intranasal priming with *Neisseria lactamica* for the induction of a systemic immune response against *Neisseria meningitidis* . Rev Inst Adolfo Lutz 2003;62:50.

21. Néri SV, Carmo MAS, Tunes CF, Ferraz AS, Thomaz Belo, EF, Coutinho, LMCC, Ito AY, De Gaspari, EN. Immune response of neonatal mice priming with heat inactivated *Neisseria lactamica*. Rev Inst Adolfo Lutz 2003; 62:50.

22. Carmo MAS, Ito AY, Néri SV, Tunes CF, Thomaz Belo, EF, Coutinho, LMCC, Ferraz AS, De Gaspari, EN. Imunização nasal :Estudo da resposta imune em camundongos neonatos imunizados com *Neisseria meningitidis* B e Bordetella pertussis como adjuvante Rev Inst Adolfo Lutz 2003; 62:38.

23. Ito AY, Néri SV, Carmo AMS, Thomaz Belo, EF, Tunes CF, Coutinho, LMCC, De Gaspari, EN. Immune response in neonatal and infants mice immunized intranasally with native outer membrane vesicles of *Neisseria meningitidis* selected to L379 -or L8 -. Rev Inst Adolfo Lutz, 2003; 62: 49.

24. Coutinho, LMCC, Thomaz Belo, EF, Seneme Ferraz A, Oliveira, APS, De Gaspari, EN. Vacinas de mucosa: Imunização intranasal para *Neisseria meningitidis* B. LAES HAES 2004;96-132.

Agência Paulista de Controle de Doenças

BEPA - Av. Dr. Arnaldo, 351 - 12º andar s. 1218
Tel.: (11) 3066-8823 / 3066-8824
e-mail: bepa-agencia@saude.sp.gov.br