

Relato de caso

Uma história contada no futuro: complexo imunogênico constituído por antígenos vacinais adsorvidos/ encapsulados em sílica mesoporosa nanoestruturada

A story told in future: complex incorporated by antigens immunogenic Vaccine Adsorbed / Encapsulated mesoporous silica nanostructured

Karina Scaramuzzi¹

Eduardo Pagani²

Regina Scivoletto²

Márcia Carvalho de Abreu Fantini³

Oswaldo Augusto Sant'Anna¹

Palavras-chave: Inovação tecnológica, conhecimento científico, nanovacinas, antígenos vacinais encapsulados

Keywords: *Technological innovation, scientific knowledge, nanovacinas, vaccine antigens encapsulated*

Introdução

Além de manter a homeostasia do organismo, a função do sistema imune é garantir a proteção mais eficaz de indivíduos, numa população natural, contra os mais diversos tipos de agentes infecciosos. As plasticidade e diversidade das estruturas, dos mecanismos e dos processos imunobiológicos que regem a resistência a infecções e toxinas foram sendo reconhecidos e estabelecidos num passado recente, mais precisamente no decorrer dos últimos 50 anos.

¹ Laboratório de Imunoquímica, Instituto Butantan

² Laboratório Cristália

³ Laboratório de Cristalografia, Instituto de Física, Universidade de São Paulo

Os processos infecciosos são, provavelmente, a principal origem de pressão seletiva sobre a evolução do sistema imune com suas redes de células e moléculas que interagem no desenvolvimento de respostas aos agentes estranhos. E, vice-versa, a rede imunológica funcional exerce seleção sobre as características de virulência, infectividade e toxicidade dos microrganismos. Mais ainda, determinando a sobrevivência desses, bem como para cada segmento da resposta imune do hospedeiro, há uma gama de fatores resultantes da participação de componentes genéticos e ambientais. Portanto, a resposta imune é resultante da co-evolução, durante longos anos, tanto de vertebrados como de microrganismos, e inclui o estabelecimento de relações comensais e simbióticas constantes. As características genéticas, os mecanismos operacionais, o complexo de efeitos pleiotrópicos do sistema imune serão afetados, em especial, pelas experiências prévias dos indivíduos com moléculas presentes em microrganismos, ou administradas através de vacinações.

Na quase totalidade das populações observa-se distribuições contínuas de fenótipos de resistência natural ou adquirida a diferentes infecções. Quanto aos patógenos, para as mais distintas características como expressões antigênicas diversas, índices de endemicidade, infectividade, virulência, há variações que incluem a diversidade genética constitutiva de uma dada população, bem como influências de fatores exógenos múltiplos. O impacto dos fatores ambientais sobre as variabilidades genéticas individuais, associado aos fenômenos imunobiológicos em populações humanas ou em outras espécies animais, fornecem uma gama de aspectos significativos sobre as adaptações: hospedeiro-microrganismo.

A influência de fatores ambientais no desenvolvimento de moléstias infecciosas de etiologia virais, bacterianas, parasitárias e fúngicas descritas nas últimas décadas, refletem a diversidade e a amplificação crescente das atividades humanas, incluindo desde a introdução de antibióticos e vacinas, até o aumento da densidade populacional resultando em alterações de hábitos e contato. Esses fatores promovem as alterações dos índices de resistência de microrganismos e, de modo abrangente, nas mudanças de ecossistemas naturais, podendo levar à expansão de vetores de agentes patogênicos ao homem e outras espécies animais. Realçamos a influência dos esquemas de vacinação, especialmente abusivos em animais, com relação às doses e intervalos entre imunizações, e pouco estudados para certas vacinas.

Há outros fatores ambientais que atuam sobre a capacidade e intensidade de resposta a um dado imunógeno, modulando características genética-

mente determinadas. É o caso dos adjuvantes, artificiais ou naturais. Dentre os últimos destacam-se os antígenos independentes do reconhecimento pelos linfócitos T [TI] como os lipopolissacarídeos presentes em bactérias Gram-negativas que, em concentrações elevadas, induzem proliferação policlonal de linfócitos B e, em baixas concentrações induzem anticorpos específicos por ligação com receptores específicos de células B [BCR]. É clássica, também, a capacidade de determinados antígenos TI promoverem a indução de citocinas, em especial $INF\gamma$, interferindo na síntese de anticorpos, como o faz o polissacarídeo de *Pneumococo* que estimula a produção de anticorpos do isótipo IgG2 em humanos. Frações solúveis de suspensões de *Bordetella pertussis* e a porção lipídica de *Mycobacterium tuberculosis* ou *M. bovis* possuem ação adjuvante. Como esses microrganismos, outros tantos devem possuir propriedades adjuvantes, indicando, portanto, que na natureza o sistema imune deve confrontar-se continuamente com estímulos conjugados epítomos-adjuvantes ou epítomos-carregadores. Há ainda os adjuvantes imunológicos artificiais que favorecem a apresentação antigênica e a imunogenicidade sem interferir na especificidade da resposta, como os tradicionais sais de Hidróxido de Alumínio e as misturas óleo-água como o adjuvante de Freund com ou sem *Mycobacterium*, esses utilizados apenas em esquemas de imunização de animais. Além dos adjuvantes, carregadores como lipossomos e microesferas biodegradáveis vêm sendo testados experimentalmente, modulando os fenótipos quantitativamente – nível e duração de respostas – e qualitativamente – isótipos [sinônimo para classe de imunoglobulina – determinada pela região constante da molécula] e citocinas produzidas.

Sílicas mesoporosas altamente ordenadas

No final de 2001, numa das viagens que fazia diariamente entre Campinas e São Paulo, a Professora Márcia Fantini do Instituto de Física da USP contou-me que havia feito um experimento de difração de raios X de uma sílica nanoestruturada, que era muito bonita esteticamente porque lembrava um favo de mel com seus hexágonos de poros perfeitos.

Lembrei-me de um estudo realizado no Laboratório de Imunogenética nos anos 1980 com outro tipo de sílica, a coloidal, que injetada em altas concentrações em camundongos constitutivamente maus produtores de anticorpos, passavam a bons respondedores. A questão central, na época, era de

que os macrófagos, células do sistema imunológico responsáveis por destruir antígenos e microrganismos em geral, nesses animais apresentavam alta capacidade catabólica, não possibilitando que o organismo desenvolvesse resposta imune efetiva. E administrando a sílica coloidal, ocorria bloqueio dessa atividade nos macrófagos e a resposta imunológica seria, digamos, resgatada.

Portanto, havia a possibilidade de que a sílica nanoestruturada pudesse carregar em seus favos um antígeno, uma vacina. Logo tive contato com os Drs. Jivaldo Matos e Lucildes Mercuri do Instituto de Química da USP que produziam esse material, a denominada SBA-15, e com eles e a mestrandia Flávia Lima programamos um experimento. A primeira surpresa: ao juntar um volume de SBA-15 com um volume de uma proteína, a resultante não era dois volumes, mas cerca de 1,5; portanto ocorrera adsorção/encapsulação da proteína à sílica. E mais extraordinário, as respostas dos camundongos que respondiam mal, passaram a produzir níveis mais elevados de anticorpos do que aqueles animais que receberam a mesma proteína adsorvida em hidróxido de alumínio $[Al(OH)_3]$, o único adjuvante licenciado para uso em humanos. Daí em diante, só tivemos êxito com o emprego dessa sílica. E há mais aspectos bastante gratificantes: essa sílica não é tóxica, não provoca reações locais ou sistêmicas adversas e, de fato, possui potencial para auxiliar na indução dos mecanismos de defesa do organismo quando administrada em associação com vacinas. **(Imagem 1)**

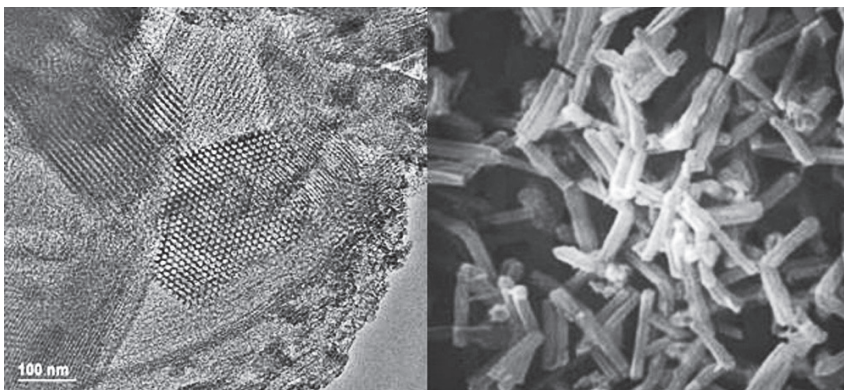


Imagem 1: Microscopia eletrônica de transmissão [TEM] da sílica mesoporosa nanoestruturada SBA-15. [A] Estrutura de poros arranjos hexagonalmente dentro dos tubos cilíndricos de comprimento $\sim 2\mu\text{m}$. [B] Interior de uma partícula mostrando a macro-porosidade e os tubos cilíndricos de sílica. Tamanho médio da partícula: $30\mu\text{m}$. Diâmetro dos poros: $\sim 10\text{nm}$. Medidas: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron [LNLS] e POLI [USP].

As sílicas mesoporosas são partículas de óxido de silício [SiO₂] com estrutura altamente organizada que, devido às suas propriedades físico-químicas, apresentam potencial de aplicação em diferentes áreas, e que vêm despertando grande interesse da comunidade científica. Esses materiais são capazes de interagir com átomos, íons e moléculas, não apenas em sua superfície, como também em seu interior. Descrita em 1998, a sílica mesoporosa SBA-15 apresenta estrutura hexagonal com poros altamente ordenados e interligados, paredes relativamente espessas e notável estabilidade térmica, hidrotérmica e mecânica. A SBA-15 é sintetizada em meio ácido, utilizando como agente direcionador de estrutura um polímero orgânico que se liga às espécies de silicatos, via ponte de hidrogênio, formando a sílica mesoporosa; após calcinação resta a sílica inorgânica SBA-15, que forma uma rede com estruturas em forma de tubos longos [da ordem de alguns microns], dispostos hexagonalmente, em um arranjo de poros bastante organizado e uniforme, com diâmetro de cerca de dez nanômetros, unidade de comprimento equivalente à bilionésima parte do metro. Dependendo da disposição dos poros e do tamanho, o material pode ter várias aplicações tecnológicas, sendo usados como catalisadores, sensores, fixação de moléculas de uma substância na superfície de outra substância, de metais pesados, e de poluentes.

Apesar dos vários estudos voltados para a utilização de sílicas como veículo para diferentes substâncias, essas não haviam sido testadas quanto à capacidade de ativar eficientemente as células apresentadoras de antígenos [APC], carrear e liberar imunógenos.

Assim, contando com pesquisadores de diferentes áreas do conhecimento, realizou-se o primeiro estudo sobre a viabilidade de emprego desse material nanoestruturado como adjuvante da imunidade que se realizou no Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, empregando-se a sílica mesoporosa SBA-15. Verificou-se que camundongos geneticamente selecionados para a baixa produção de anticorpos imunizados com Intimina 1β [proteína de *E. coli*] ou veneno total da serpente *Micrurus ibiboboca* encapsulado/adsorvido a SBA-15 apresentaram aumento significativo dos títulos de anticorpos específicos para a proteína e para o veneno da serpente, sendo a resposta secundária semelhante ou mais elevada comparativamente aos animais imunizados com esses imunógenos em Al(OH)₃. Ainda, verificou-se que a sílica SBA-15 foi capaz de modular positivamente a resposta imune humoral de camundongos maus respondedores, os quais após imunizações com soro albumina bovina [BSA] pelas vias oral e intramuscular passaram a produzir

títulos de IgG semelhantes aos camundongos bons respondedores. Esse trabalho foi descrito na Monografia de Mestrado de Luciana Vieira Carvalho. Esses dados em conjunto indicam a participação da SBA-15 na ativação do sistema imunológico e na indução de memória, mecanismo essencial para a proteção induzida por processos de vacinação.

Conhecimento e desenvolvimento de uma nanovacina

Em 2005, após apresentação dos primeiros resultados num Simpósio, a farmacologista Professora Regina Scivoletto, levou-me para conhecer o Laboratório Cristália, uma das principais indústrias de produtos químicos e farmacêuticos do Brasil. Os resultados foram apresentados numa reunião à qual, além do Presidente e dos Diretores do Cristália, estavam presentes os Membros do Conselho Científico e, após argüição e discussão dos aspectos essenciais desse novo conhecimento, decidiu-se pelo apoio para o desenvolvimento rumo à eventual aplicação.

Em 12 de setembro de 2005, foi depositada a patente *Complexo imunogênico formado por antígenos vacinais encapsulados por sílica mesoporosa nanoestruturada*, em parceria com o Laboratório Cristália, que recebeu o número PI 0503817-0 e, em novembro de 2008, foi obtida a Patente Internacional. Saliente-se que o Projeto constituía uma das linhas de pesquisas do Programa CEPID-FAPESP – Centro de Toxinologia Aplicada – sediado no Instituto Butantan. Assim, foi possível contar com a FAPESP durante os trâmites que conduziram à Patente.

A parceria com o Laboratório Cristália extrapolou o simples contato formal para desenvolvimento de um eventual produto. Os Drs. Ogari de Castro Pacheco, Roberto Debom, Regina Scivoletto, Jorge Afune, Eduardo Pagani, em especial, juntaram-se ao projeto de pesquisa, e diria, passaram a integrar nosso núcleo de estudos. Ao longo desses últimos quatro anos, discutiu-se com freqüência os resultados, estabelecemos em conjunto os protocolos e as perspectivas. Além dos estudos sobre os aspectos imunobiológicos relativos à ação da SBA-15, realizaram-se ensaios para avaliar as respostas imunes e inflamatória com a sílica misturada à vacina para Hepatite A, comercializada pela Cristália e com a vacina para Hepatite B, produzida pelo Instituto Butantan. Como os estudos de toxicidade são padronizados e caros, ficaram a cargo da Cristália, que contratou um centro especializado em toxicologia para a realização dos

testes. Confirmando o que havia sido observado, ao longo dos vários experimentos com camundongos, nenhum efeito negativo foi observado.

Ao longo dos estudos, decidimos administrar as vacinas em SBA-15 pela via oral. Locais importantes na indução da imunidade de mucosas compõem o tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal - GALT [*Gut-associated lymphoid tissues*] - e compreendem estruturas como as placas de Peyer no intestino delgado, folículos linfóides isolados no ceco e apêndice e linfonodos mesentéricos. O método de vacinação oral é o mais conveniente no âmbito sócio-econômico; a facilidade de aplicação, o fato de ser pouco invasiva, e de apresentar reduzidos efeitos colaterais, como os comumente observados após imunizações parenterais, são algumas das suas vantagens frente a outras vias de inoculação. Inicialmente acreditava-se que a geração da imunidade de mucosas ocorria através de imunização tópica, contudo vacinas intramusculares ou subcutâneas induzem baixa proteção ao organismo comparando-se às imunizações feitas pelas vias: nasal ou oral, especialmente quando a porta de entrada do agente infeccioso é o trato gastrointestinal. Entretanto, existem limitações para a imunização oral, entre elas encontram-se as alterações causadas nos antígenos durante o tráfego pelo trato gastrointestinal e fatores ambientais como a acidez elevada e a ação de proteases que podem levar a alterações e desnaturações, com subsequente precipitação do antígeno na luz intestinal, diminuição da afinidade com a superfície das células M e ocupação das placas de Peyer por peptídeos-epítopos inativos, prejudicando o desenvolvimento da resposta imunológica.

A análise dos resultados obtidos a partir das imunizações por essa via com a vacina contra Hepatite A e gama globulina humana, adsorvidas em SBA-15 comprovam a aplicabilidade dessa sílica como suporte para antígenos e evidenciam sua eficácia enquanto adjuvante de mucosas salvaguardando as propriedades imunogênicas e protegendo os antígenos da ação adversa do meio ácido do trato gastrointestinal. Os níveis aumentados de anticorpos específicos séricos e secretores das classes IgA e IgG indicam que a SBA-15 é eficiente na indução de resposta de anticorpos sem polarizar a resposta imunológica à determinada classe de linfócitos. Corroborado pelos títulos de anticorpos protetores, os números aumentados especialmente de linfócitos observados nas placas de Peyer e linfonodos mesentéricos de camundongos imunizados com os antígenos em sílica, indicam que houve proliferação de células imunocompetentes e a potencialização da resposta imune após o uso dessas nanoestruturas como adjuvante. Ainda, a SBA-15

mostrou-se eficiente no recrutamento de macrófagos e células dendríticas, tanto após imunizações pela via oral quanto subcutânea.

Os estudos serão ampliados, enfatizando-se seu papel da SBA-15 sobre as estruturas e células do sistema imunológico do trato gastrointestinal em especial a Lâmina-Própria, bem como sua atuação na manutenção de memória imunológica protetora. Em seu aspecto aplicado, um dos próximos passos conduzirá à pesquisa clínica, que consiste em administrar o complexo imunogênico em seres humanos e observar a ação adjuvante efetiva dessa sílica nanoestruturada.

Nesses quatro anos de parceria foram produzidas as dissertações de Mestrado de Luciana Vieira Carvalho [Bolsista FAPESP] e Karina Scaramuzzi [Bolsista CNPq], defendidas junto ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, e de Francisco Mariano Neto [Bolsista Cristália], junto ao Instituto de Física da USP. Os doutorados de Karina [Bolsa CAPES – Programa INCTTOX] e Francisco [Bolsa CNPq] tiveram início nesse segundo semestre, e Luciana Vieira Carvalho [Bolsista FAPESP] defenderá sua tese ainda em 2010. Além desses Pós-Graduandos, a estudante de Iniciação Científica do Laboratório de Cristalografia, Aline dos Santos Lira Durães, recebe uma Bolsa de Estudos do Laboratório Cristália.

Inovação – ouvindo uma história sendo contada no futuro

A geração de conhecimentos é a verdadeira inovação!

Além de promover a indução de imunidade efetiva de maneira mais homogênea de uma população, evitando que um percentual de pessoas que normalmente apresentam baixa resposta imune passe a ser mais bem protegidas, a utilização desse novo adjuvante, muito provavelmente, reduzirá a concentração de antígenos vacinais, e a diminuição de aplicações de doses de vacina, garantindo uma imunização eficaz. Obviamente, haverá redução de custos de produção e do preço do produto.

Reproduzo as palavras do Governador de São Paulo, José Serra, recentemente durante evento de inauguração do Centro de PD&I do Laboratório Cristália em Itapira, SP:

“As empresas não sabem utilizar o potencial de inovação propiciado por essas pesquisas. Dessa maneira, o avanço da ciên-

cia não tem tido efeito sobre o aumento da riqueza nacional que poderia ter, inclusive com novos postos de trabalho. O avanço da ciência no Brasil não vira PIB”.

Essa declaração do Governador reforça a posição dos Governos Estadual e Federal que se evidencia na política de C&T que vem sendo aplicadas, pela primeira vez no Brasil nesses últimos anos. Dentre os aspectos positivos, saliente-se a continuidade e expansão dos investimentos em Programas que se consolidaram nos âmbitos do CNPq, FINEP e FAPESP.

Ao contrário do desenvolvimento tecnológico, no qual durante seu processo o acontecer pode ser previsto, o conhecimento científico, de fato, depende do amadurecimento, leva tempo para ser assimilado e não tem hora marcada para consolidar-se. A virtude da paciência, tão rara em tempos recentes, é pouco exercitada. Mesmo nos meios acadêmicos, ambiente propício à geração de conhecimentos que se faz progressivamente e com muita reflexão, não há tempo, pois há que produzir artigos [ou *papers* como dizem], há que conquistarem-se verbas, espaço físico e impor influências. Vaidades e sentimento de posse à parte, pouco sobra para entender o próximo ou as diversidades de pensamento, para exercitar a autocritica do que se critica, ou simplesmente perguntar-se, *para quem* a pesquisa que realizamos?

Regras, leis, convenções, mitos e lendas, o *Homo sapiens* as estabelece, modifica, elimina... E segue a vida! A noção de progresso, muito recente ao longo da história da humanidade, vincula-se ao ganho, à competição e imediatismo, às vantagens do indivíduo sobre o coletivo. E o bom senso dilui-se ou é sumariamente abolido!

A real e única autonomia é a intelectual! Propriedade intelectual x propriedade de um produto: um falso dilema num emaranhado de regras, barreiras, que acabam por gerar paradoxos que soam, no mínimo, confusos. Como salienta o Dr. Pacheco, Diretor-Presidente do Laboratório Cristália:

“...investir em pesquisa e inovação não é a prioridade para o empresário brasileiro. Não são raras as vezes que descobertas importantes das nossas universidades passam despercebidas por aqui e acabam virando inovação — que nós depois importamos — nas mãos de empresas multinacionais”.

Mas esses são aspectos de outro capítulo que em breve escreveremos. Assim, fica um último e não menos importante registro: *Seja no setor estatal, seja no setor privado, o essencial é trabalhar para tornar o bem público!*

• *Esse estudo conta com apoio da FAPESP e integra o Subprograma IMUNOLOGIA do INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM TOXINAS [INCTTOX] – CNPq/FAPESP.*

• *M.C.A. Fantini e O.A. Sant’Anna são Pesquisadores do CNPq.*

Data do recebimento do artigo: 16/11/2009

Data de aprovação : 25/03/2010