

JOÃO FERREIRA MARTINS

Estudo sobre a reação inflamatória produzida pela vacina contra a difteria, o tétano e a coqueluche (DTP) em camundongos.

PPGVS/ INCQS

FIOCRUZ

2006

Estudo sobre a reação inflamatória produzida pela vacina contra a difteria, o tétano e a coqueluche (DTP) em camundongos.

João Ferreira Martins

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores:

Dr. Hugo Caire Castro Faria Neto

Dra. Isabella Fernandes Delgado

Rio de Janeiro  
2006

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Título: Estudo sobre a reação inflamatória produzida pela vacina contra a difteria, o tétano e a coqueluche (DTP) em camundongos.

Autor:

João Ferreira Martins

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

Prof. Dr. Mauro Velho de Castro Faria (UERJ)

---

Profª. Dra. Helena Pereira da Silva Zamith (FIOCRUZ)

---

Profª. Dra. Ellen Jessouroun – suplente (FIOCRUZ)

---

Dra. Isabella Fernandes Delgado – Orientador (FIOCRUZ)

---

Dr. Hugo Caire Castro Faria Neto – Orientador (FIOCRUZ)

---

Rio de Janeiro

## FICHA CATALOGRÁFICA

Martins, Ferreira João

Estudo sobre a reação inflamatória produzida pela vacina contra a difteria, o tétano e a coqueluche (DTP) em camundongos./João Ferreira Martins. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2006.

xxi, p. 122, il., tab.

Dissertação em Vigilância Sanitária, Prog. Pós-Graduação em Vigilância Sanitária/ INCQS, 2006. Orientadores: Hugo Caire Castro Faria Neto/Isabella Fernandes Delgado.

1. Vacina DTP e Reação Inflamatória. 2. Edema de Pata. 3. Leucometria. 4. Reações Adversas associadas à vacina. 5. Citocinas.

I. Título.

**“De todos os bens que a sabedoria nos faculta como meio de obter a nossa felicidade, o da amizade é de longe o maior”.**

*Epicuro, 341-270 a.C*

**Dedico este trabalho à minha esposa Maria Tereza, ao maior de todos os presentes que ela me deu, o meu filho e meu amigo Vitor e aos meus orientadores Hugo e Isabella.**

**Homenagem especial a memória dos meus pais, Octávio Martins e Maria Ferreira Martins cujas lembranças estão sempre vivas em minha mente.**

## AGRADECIMENTOS

Neste momento em que me encontro com o sentimento do dever cumprido para com a Instituição na qual trabalho e com aqueles que se dispuseram a me orientar, sou levado a refletir sobre o início de todo este processo.

Tudo começou nas conversas solitárias. Eu e meus pensamentos.

Tenho a impressão que possivelmente todo empreendimento que almejamos realizar tem início desta forma.

As idéias foram então colocadas no papel e a seguir executadas e a partir daí acontece um novo processo, diferente daquele início.

Uma dinâmica nasce e toma forma.

Em cada momento um novo relacionamento.

O processo de forma alguma, a partir de então, se dará solitário.

E chega o momento agradecer. No meu entender não é somente um agradecimento, mas sim um registro escrito da memória dos acontecimentos: do simples bom dia àquela conversa informal ou de ajuda.

De ajuda no trabalho de rotina ou nas fases preliminares do projeto ou ajudas em formas de “dicas” para os experimentos.

Enfim, por tudo e por não ter estado sozinho, venho agradecer a todos que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

Desta maneira, em especial, agradeço:

- Ao meu orientador Hugo Caire Castro Faria Neto, pela oportunidade, por acreditar no projeto e por seu total apoio. Meu mais novo amigo.

- A minha orientadora Isabella Fernandes Delgado, pela sua simpatia e desprendimento em se engajar em um projeto em andamento. Pelo seu carinho, ajuda, preocupação, participação e atenção. Minha amiga.

Sou eternamente grato aos dois.

- A inestimável ajuda da Eloisa Alves do Departamento de Farmacologia do INCQS, não somente pelo preparo dos cortes histológicos, mas pela atenção, dedicação, participação e empenho.

- Aos meus colegas de trabalho: Roseli e Valdo pela ajuda nos primeiros ensaios. A Joana e ao Joel por estarem sempre prontos a ajudar.

- Ao Fernando Fíngola, chefe do Departamento de Farmacologia do INCQS, pela compreensão e por procurar sempre ajudar.

- A doutora Helena Zamith, do Departamento de Farmacologia do INCQS pela ajuda e por ensinar-me o ensaio CHO.

- A Sheila Albertino, do Departamento de Farmacologia do INCQS, pela ajuda e pelo ensino do LAL.
- Ao Reginaldo Assad Miller, Chefe do Setor de Animais de Laboratório do INCQS, pela ajuda na obtenção e manutenção dos animais para os ensaios e pelo companheirismo, extensivo aos colegas do Setor.
- Ao Fábio Mesquita, doutorando do Laboratório de Imunofarmacologia do IOC, pela ajuda nos ensaios preliminares.
- Ao Valber Frutuoso, do Laboratório de Imunofarmacologia do IOC, por gentilmente ceder-me o pletismômetro para meus ensaios.
- A Rachel Novaes Gomes, mestranda do Laboratório de Imunofarmacologia do IOC, pelos protocolos do ensaio de ELISA.
- A Daniele, do Laboratório Noel Nutels. Pela conversa agradável, desprendimento, pelos conselhos e dicas. Minha mais nova amiga.
- A Adrianinha, doutoranda do Laboratório de Imunofarmacologia do IOC. Pela conversa agradável, desprendimento, ajuda, pelos conselhos e dicas. Outra mais nova amiga.
- A todos com os quais convivi no laboratório de Imunofarmacologia do IOC e que sempre tiveram uma conversa amigável: Surrage, Zanon, Rodrigo, doutora Clarisse, Rose, Helô, Nelson do Biotério, meus outros novos amigos.
- Ao Alexandre Dias, Antônio Miguel, Jarbas Emílio, Antônio Eugênio, Márcia Lopes companheiros do INCQS, pelo apoio e força que sempre me deram.
- Aos doutores do Departamento de Farmacologia e Farmacodinâmica do IOC: Dr. Marco Aurélio Martins, sempre solícito quando necessitava de algum material com urgência; ao Dr. Jonas Perales e ao Richard, pela utilização da leitora das placas de ELISA.
- A Marisa Adati e a Helena, companheiras do Departamento de Imunologia do INCQS, pelas dicas e utilização dos equipamentos do Laboratório de Hemoderivados.
- A Marília Martins Nishikawa, do Departamento de Microbiologia do INCQS, pela ajuda na obtenção dos slides dos cortes histológicos junto ao pessoal da parte de imagens e fotografia do IOC, a quem também agradeço.
- A doutora Maria Helena coordenadora do curso de pós-graduação do INCQS, pela preocupação com o andamento do projeto e compra de materiais, sempre empenhada em ajudar, e por sua compreensão.
- A Paola Cardarelli, do Departamento de Microbiologia do INCQS, que foi a primeira a ler meu projeto e me recomendou ao doutor Hugo Caire Castro Faria Neto.

- A Maria Aparecida Affonso Boller, pelo carinho e pela ajuda na correção final do texto.
- Aos meus amigos e familiares.
- A todos que torceram por mim e aos que eu tenha esquecido de mencionar.

## RESUMO

Mesmo estando associada a reações adversas severas como distúrbios neurológicos, choques e convulsões, a vacina DTP vem sendo utilizada há pelo menos 70 anos e, segundo a OMS, ainda continua sendo uma demanda social importante como medida profilática no controle da coqueluche, fazendo parte dos programas de imunização de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento.

Apesar da utilização de ensaios de toxicidade para o controle desta vacina, pouca informação pode ser obtida no que diz respeito à avaliação da relação entre sua toxicidade em modelos animais e a ocorrência de reações adversas com a vacinação em humanos. A fisiopatologia das reações adversas associadas à vacina DTP ainda não está totalmente compreendida, mas uma série de evidências demonstram que o conteúdo de Lipopolissacarídeo (LPS) e de resíduos ativos da Toxina Pertussis (PT) presentes na vacina são os responsáveis por estas complicações, sejam elas locais ou sistêmicas.

Em nosso trabalho, investigamos a resposta inflamatória produzida em camundongos por duas vacinas DTP de diferentes produtores (DTP-1 e DTP-2) em um estudo comparativo com as vacinas DT, DTP Acelular e uma vacina de Referência. Utilizando-se da metodologia da medida do edema de pata em camundongos que constitui-se de um modelo que permite a investigação de reações locais e do estudo da população de leucócitos, que constitui-se de um modelo de investigação da reação sistêmica, procuramos investigar a resposta inflamatória aguda induzida pela vacina DTP. Esta medida do edema foi tomada através de um pletismômetro e a contagem de células foi feita em câmaras de Neubauer.

Paralelamente, foram também realizados: um estudo histopatológico, onde analisou-se o envolvimento dos tecidos epitelial e muscular; a dosagem do conteúdo de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) pelo método de ELISA; a quantificação do conteúdo de LPS através do LAL para todas as vacinas e a quantificação do conteúdo da PT pelo método do efeito "clustering" em células CHO para as vacinas que contêm o componente pertussis.

Observamos que o edema de pata foi mais intenso nas vacinas onde o conteúdo de PT foi maior como na DTP-2 e Referência, não descartando um possível envolvimento do LPS. A vacina de Referência destacou-se pela alta concentração de LPS. Os leucócitos sofreram alterações após o tratamento com as vacinas DTP-1, DTP-2 e Referência, com promoção de acentuada neutrofilia, sendo também observado, em alguns casos discreto aumento dos linfócitos e dos monócitos. A análise histopatológica revelou a formação de intenso exsudato purulento e acúmulo de polimorfonucleares para todas as vacinas. Com relação a produção de citocinas pró-inflamatórias, foi evidenciada somente a citocina IL-6, citocina característica de processos inflamatórios causados por bactérias. A presença desta interleucina foi detectada somente para as vacinas DTP-1, DTP-2 e Referência.

## ABSTRACT

DTP vaccine has been used for more than 70 years and still represents a major prophylactic measure in the control of pertussis, tetanus and diphtheria infections despite being associated with severe adverse reactions such as neurological derangements, seizures and shock. Sparse information can be obtained regarding the correspondence between toxicity test in animal models and the occurrence of adverse reactions upon vaccination of humans. The mechanisms implicated in the adverse reactions associated with DTP vaccine is still not fully understood, but several evidence point to LPS and active residues of pertussis toxin (PT) as the main culprits for local and systemic complications. In this work we investigated the inflammatory response induced by two different DTP vaccines (originated from two different producers – DPT-1 and DPT-2) in mice and compared this with DT vaccine, acellular DPT vaccine, and a Reference vaccine. We applied the paw edema model using a pletismograph, followed by systemic analysis of the leukogram, analysis of the blood levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 , IL-6 e TNF- ) and histopathological analysis of the paw tissue. LPS and PT contents were determined by the LAL and CHO cells clustering test, respectively. We observed that paw edema was more intense in those vaccines with a higher content of PT, although the contribution of LPS to the reaction could not be ruled out. A marked neutrophilia and a discrete increase in lymphocyte and monocyte numbers were observed with DPT-1, DPT-2 and the Reference vaccine. Histological examinations revealed an intense exsudative process with neutrophilia and pus formation in all vaccines tested. Cytokine analysis showed that IL-6 was the only cytokine with increased levels detected after DTP-1, DPT-1 and Reference vaccine challenge.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ac - Toxina Adenilato Ciclase

ADP	-	Di-fosfato de adenosina
Agg	-	Aglutinogênios ou Aglutinógenos
AMA	-	American Medical Association
AMPc	-	Mono-fosfato de adenosina cíclico
BCG	-	Vacina contra Tuberculose
B-G	-	Bordet - Gengou
brK	-	Proteínas do Locus da Soro-Resistência
BSA	-	Albumina Bovina Sérica
CECAL	-	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CD+	-	Grupo de Diferenciação
CDC	-	Center of Disease Control and Prevention
CFR	-	Code Federal Regulation
CHO	-	Células de Ovário de Ramster
CO	-	Dióxido de Carbono
°C	-	Graus Celsius
DAS	-	Departamento de Informação e Informática do SUS - DATASUS
DNA	-	Ácido Desoxiribonucleico
DNT	-	Toxina Dermonecrótica
DT	-	Vacina Dupla (contra Difteria e o Tétano)
DTP	-	Vacina contra Difteria, Tétano e Coqueluche
DTPa	-	Vacina contra Difteria, Tétano e Coqueluche Acelular
DTP-1	-	Vacina contra Difteria, Tétano e Coqueluche - 1
DTP-2	-	Vacina contra Difteria, Tétano e Coqueluche - 2
EAE	-	Encefalomielite Experimental Alérgica
ECM	-	Matriz Extra Celular
EDTA	-	Ethylenediamine tetra-acetic acid
EHH	-	Episódio Hipotônico-Hiporesponsivo
ELISA	-	Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
EUA	-	Estados Unidos da América
FDA	-	Food and Drugs Administration
FHA	-	Hemaglutinina Filamentosa
GMPc	-	Guanosina 3'- 5' mono-fosfato cíclica
GTP	-	Guanosina Trifosfato

HSF	-	Fator Sensibilizante `a Histamina
HTL	-	Toxina Termo-Lábil
INCQS	-	Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde
IL-1	-	Interleucina tipo 1 Beta
IL-6	-	Interleucina tipo 6
JMR	-	Japanese Minimum Requirements for Biological Products
KDa	-	Kilodaltons
kg	-	Quilograma
LAL	-	Limulus Amebocyte Lisate
Lf	-	Limite de Flocculação
LPF	-	Fator Promotor de Linfocitose
LPS	-	Lipolissacarídeo
MEM	-	Minimum Essential Medium
MMWR	-	Morbidity and Mortality Weekly Report
MPA	-	Antígeno Protetor em Camundongos
L	-	Microlitros
mL	-	Mililitros
mm <sup>3</sup>	-	Milímetros cúbicos
MRC	-	Medical Research Counsill
M.S.	-	Ministério da Saúde (Brasil)
NAD	-	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
ng	-	Nanogramas
Ni	-	Níquel, metal presente como co-fator enzimático
NIBSC	-	Institute for Biological Standards and Control
NIH	-	National Institute of Health
OMP	-	Outras Proteínas de Membrana
OMS	-	Organização Mundial de Saúde
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase
PMN	-	Polimorfonucleares
POP	-	Procedimento Operacional Padrão
PBS	-	Tampão Fosfato
PT	-	Toxina Pertussis
Ptc	-	Pertactina
Ref	-	Vacina de Referência

RTX	-	Repeat toxin - Pertencente a família das citotoxinas que possuem ação lítica. Apresentam uma seqüência repetida dos aminoácidos glicina/aspártico.
TC	-	Citotoxina Traqueal
Tcf	-	Fator de Colonização Traqueal
TGF-	-	Fator de Crescimento Transformante beta
Th	-	Linfócitos T helper
TNF-	-	Fator de Necrose Tumoral alfa
TT	-	Toxóide Tetânico
OPD	-	o - phenylenediamine
UE	-	Unidades de Endotoxina
UI	-	Unidades Internacionais
VAERS	-	Vaccine Adverse Events Reporting System
VCA	-	Vaccine Compensation Act
WHO	-	World Health Organization

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Incidência da coqueluche e taxa de vacinação no Brasil</i>	5
<i>Figura 2: Incidência da Coqueluche nos EUA</i>	6
<i>Figura 3: Distribuição da Incidência da coqueluche nos EUA, por faixa etária</i>	6
<i>Figura 4: Possíveis papéis das substâncias biologicamente ativas produzidas pela B. pertussis</i>	7
<i>Figura 5: Histologia normal da estrutura da epiderme</i>	50
<i>Figura 6: Pata Tratada com a vacina DTP-1 após 2 horas</i>	50
<i>Figura 7: Pata Tratada com a vacina DTP-1 após 6 horas</i>	50
<i>Figura 8: Pata Tratada com a vacina DTP-1 após 24 horas</i>	51
<i>Figura 9: Pata Tratada com a vacina DTP-1 após 48 horas</i>	51
<i>Figura 10: Pata Tratada com a vacina DTP-1 após 72 horas</i>	51
<i>Figura 11: Pata Tratada com a vacina DTP-1 após 96 horas</i>	52
<i>Figura 12: Pata Tratada com a vacina DTP-2 após 2 horas</i>	59
<i>Figura 13: Pata Tratada com a vacina DTP-2 após 6 horas</i>	59
<i>Figura 14: Pata Tratada com a vacina DTP-2 após 24 horas</i>	60
<i>Figura 15: Pata Tratada com a vacina DTP-2 após 48 horas</i>	60
<i>Figura 16: Pata Tratada com a vacina DTP-2 após 96 horas</i>	60
<i>Figura 17: Pata Tratada com a vacina Ref após 2 horas</i>	67
<i>Figura 18: Pata Tratada com a vacina Ref a pós 6 horas</i>	67
<i>Figura 19: Pata Tratada com a vacina Ref após 12 horas</i>	68
<i>Figura 20: Pata Tratada com a vacina Ref após 24 horas</i>	68
<i>Figura 21: Pata Tratada com a vacina Ref após 48 horas</i>	69
<i>Figura 22: Pata Tratada com a vacina Ref após 72 horas</i>	69
<i>Figura 23: Pata Tratada com a vacina Ref após 96 horas</i>	69
<i>Figura 24: Pata Tratada com a vacina DT após 2 horas</i>	76
<i>Figura 25: Pata Tratada com a vacina DT após 12 horas</i>	76
<i>Figura 26: Pata Tratada com a vacina DT após 24 horas</i>	76
<i>Figura 27: Pata Tratada com a vacina DT após 48 horas</i>	77
<i>Figura 28: Pata Tratada com a vacina DT após 96 horas</i>	77
<i>Figura 29: Pata Tratada com a vacina DTPa após 2 horas</i>	82
<i>Figura 30: Pata Tratada com a vacina DTPa após 24 horas</i>	82
<i>Figura 31: Pata Tratada com a vacina DTPa após 48 horas</i>	82
<i>Figura 32: Pata Tratada com a vacina DTPa após 72 horas</i>	83
<i>Figura 33: Pata Tratada com a vacina DTPa após 96 horas</i>	83

## LISTA DE QUADROS e GRÁFICOS

<i>Quadro 1: Casos confirmados de coqueluche em regiões brasileiras</i>	5
<i>Quadro 2: Fatores de virulência que atuam na patogênese da coqueluche</i>	9
<i>Quadro 3: Componentes da B. pertussis e seus possíveis papéis na patogênese e na imunidade</i>	10
<i>Quadro 4: Principais atividades da PT in vivo</i>	13
<i>Quadro 5: Eventos adversos no período de 48 horas após a aplicação da vacina</i>	27
<i>Quadro 6: DTP-1 Composição segundo bula</i>	34
<i>Quadro 7: DTP-2 Composição segundo o rótulo</i>	35
<i>Quadro 8: DTPa Composição completa segundo bula</i>	35
<i>Quadro 9: DT Composição segundo documentação anexa</i>	35
<i>Quadro 10: Vacina de Referência – Composição</i>	35
<i>Quadro 11: Conteúdo dos antígenos encontrados na vacina DTP clássica</i>	36
<i>Gráfico 1: Variação do edema produzido pela vacina DTP 1</i>	48
<i>Gráfico 2: Dosagem da concentração de IL-6 por ELISA (DTP-1)</i>	55
<i>Gráfico 3: Variação do edema produzido pela vacina DTP 2</i>	57
<i>Gráfico 4: Dosagem da concentração de IL-6 por ELISA (DTP-2)</i>	62
<i>Gráfico 5: Variação do edema produzido pela vacina de Referência</i>	65
<i>Gráfico 6: Dosagem da concentração de IL-6 por ELISA (Ref)</i>	71
<i>Gráfico 7: Variação do edema produzido pela vacina DT</i>	74
<i>Gráfico 8: Variação do edema produzido pela vacina DTPa</i>	80
<i>Gráfico 9: Curva da medida do edema dos cinco produtos testados</i>	87

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Relação entre a ocorrência do efeito clustering e o conteúdo de Toxina Pertussis Ativa (DTP-1)</i>	45
<i>Tabela 2: Relação entre a ocorrência do efeito gel clot e o conteúdo de Endotoxina (DTP-1)</i>	47
<i>Tabela 3: Vacina DTP 1 - Valores Médios da Medida do Edema de Pata</i>	48
<i>Tabela 4: Análise dos Leucócitos antes e após o tratamento com a vacina DTP-1</i>	53
<i>Tabela 5: Relação entre a ocorrência do efeito clustering e o conteúdo de Toxina Pertussis Ativa (DTP-2)</i>	56
<i>Tabela 6: Relação entre a ocorrência do efeito gel clot e o conteúdo de Endotoxina (DTP-2)</i>	56
<i>Tabela 7: Vacina DTP 2 - Valores Médios da Medida do Edema de Pata</i>	59
<i>Tabela 8: Análise dos Leucócitos antes e após o tratamento com a vacina DTP-2</i>	61
<i>Tabela 9: Relação entre a ocorrência do efeito clustering e o conteúdo de Toxina Pertussis Ativa (Ref)</i>	63
<i>Tabela 10: Relação entre a ocorrência do efeito gel clot e o conteúdo de Endotoxina (Ref)</i>	64
<i>Tabela 11: Vacina Referência - Valores Médios da Medida do Edema de Pata</i>	64
<i>Tabela 12: Análise dos Leucócitos antes e após o tratamento com a vacina Referência</i>	70
<i>Tabela 13: Relação entre a ocorrência do efeito clustering e o conteúdo de Toxina Pertussis Ativa (DT)</i>	72
<i>Tabela 14: Relação entre a ocorrência do efeito gel clot e o conteúdo de Endotoxina (DT)</i>	73
<i>Tabela 15: Vacina DT - Valores Médios da Medida do Edema de Pata</i>	74
<i>Tabela 16: Análise dos Leucócitos antes e após o tratamento com a vacina DT</i>	77
<i>Tabela 17: Relação entre a ocorrência do efeito clustering e o conteúdo de Toxina Pertussis Ativa (DTPa)</i>	78
<i>Tabela 18: Relação entre a ocorrência do efeito gel clot e o conteúdo de Endotoxina (DTPa)</i>	79
<i>Tabela 19: Vacina DTPa - Valores Médios da Medida do Edema de Pata</i>	80

<i>Tabela 20: Análise dos Leucócitos antes e após o tratamento com a vacina DTPa</i>	84
<i>Tabela 21: Relação: "Ensaio, Resposta, Produto"</i>	86
<i>Tabela 22: Relação PT Ativa, LPS e Edema Máximo</i>	89
<i>Tabela 23: Evento Histopatológico</i>	89

## SUMÁRIO

<i>I. INTRODUÇÃO</i>	<i>1</i>
<i>I.1 A Vacina DTP: Considerações Gerais, Uso e Controle</i>	<i>1</i>
<i>I.2 A coqueluche e os fatores de virulência da Bordetella pertussis</i>	<i>4</i>
<i>I.3 O Gênero Bordetella</i>	<i>8</i>
<i>I.4 Fatores de Virulência da B. pertussis</i>	<i>9</i>
<i>I.4.1 Filamentos de Hemaglutinina (FHA)</i>	<i>10</i>
<i>I.4.2 Fímbrias (Agg)</i>	<i>10</i>
<i>I.4.3 Pertactina (69-kDa)</i>	<i>11</i>
<i>I.4.4 A Toxina Pertussis (PT)</i>	<i>11</i>
<i>I.4.5 Atividades Biológicas da Toxina Pertussis</i>	<i>12</i>
<i>I.4.6 Adenilato Ciclase ou Hemolisina (Ac)</i>	<i>13</i>
<i>I.4.7 Toxina Dermonecrótica (DCT) ou Toxina Termo-Lábil (HLT)</i>	<i>13</i>
<i>I.4.8 Citotoxina Traqueal (TC)</i>	<i>14</i>
<i>I.4.9 Lipopolissacarídeo (LPS)</i>	<i>15</i>
<i>I.4.10 Fator de Colonização traqueal (Tcf)</i>	<i>15</i>
<i>I.4.11 Proteínas do Locus da Soro Resistência (brk locus)</i>	<i>15</i>
<i>I.5 A Vacina contra Coqueluche</i>	<i>16</i>
<i>I.5.1 As primeiras pesquisas (1906 a 1930)</i>	<i>16</i>
<i>I.5.2 O desenvolvimento da vacina contra a coqueluche (1930 a 1940)</i>	<i>18</i>
<i>I.5.3 O surgimento da vacina DTP e os problemas relacionados ao seu uso (1940 a 1990)</i>	<i>20</i>
<i>I.5.4 Eventos Adversos que ocorrem após o uso das vacinas que contêm os componentes Diftérico, Tetânico e Pertussis</i>	<i>26</i>
<i>I.6 Relevância do Trabalho</i>	<i>31</i>
<i>II. OBJETIVOS</i>	<i>33</i>
<i>II.1 Objetivo Geral</i>	<i>33</i>
<i>II.2 Objetivos específicos</i>	<i>33</i>
<i>III. MATERIAL E MÉTODOS</i>	<i>34</i>
<i>III.1 Animais</i>	<i>34</i>
<i>III.2 Produtos Testados</i>	<i>34</i>
<i>III.2.1 Duas Vacinas DTP: DTP 1 e DTP 2 (de produtores diferentes)</i>	<i>34</i>
<i>III.2.2 Vacina DTP Acelular</i>	<i>35</i>
<i>III.2.3 Vacina Dupla Infantil</i>	<i>35</i>

III.2.4 Vacina de Referência	35
III.3 Ensaio <i>in vitro</i> de clustering em células CHO	36
III.4 Quantificação da Endotoxina pelo método do LAL	38
III.5 Medida do Edema	39
III.6 Análise Histopatológica	40
III.7 Contagem Total e Diferencial das Células Sangüíneas	40
III.8 Dosagens das Citocinas	41
III.9 Análise Estatística	42
III.10 Preparo das Soluções	43
III.11 Reagentes	44
IV. RESULTADOS	45
IV.1 Resultados referentes a vacina DTP-1	45
IV.1.1 Ensaio clustering em células CHO	45
IV.1.2 Ensaio do Limulus Amebocyte Lisate (LAL) ou Ensaio de Endotoxina	46
IV.1.3 Edema de Pata	47
IV.1.4 Análise Histopatológica	48
IV.1.5 Leucometria Total e Diferencial	53
IV.1.6 Análise das Citocinas	54
IV.2 Resultados referentes a vacina DTP-2	56
IV.2.1 Ensaio clustering em células CHO	56
IV.2.2 Ensaio do Limulus Amebocyte Lisate (LAL)	56
IV.2.3 Edema de Pata	57
IV.2.4 Análise Histopatológica	58
IV.2.5 Leucometria Total e Diferencial	61
IV.2.6 Análise das Citocinas	61
IV.3 Resultados obtidos com a Vacina de Referência (Ref)	63
IV.3.1 Ensaio clustering em células CHO	63
IV.3.2 Ensaio do Limulus Amebocyte Lisate (LAL) ou Ensaio de Endotoxina	63
IV.3.3 Edema de Pata	64
IV.3.4 Análise Histopatológica	66
IV.3.5 Leucometria Total e Diferencial	70
IV.3.6 Análise das Citocinas	71
IV.4 Resultados referentes a vacina DT	72

<i>IV.4.1 Ensaio clustering em células CHO</i>	72
<i>IV.4.2 Ensaio do Limulus Amebocyte Lisate (LAL)</i>	
<i>ou Ensaio de Endotoxina</i>	73
<i>IV.4.3 Edema de Pata</i>	74
<i>IV.4.4 Análise Histopatológica</i>	75
<i>IV.4.5 Leucometria Total e Diferencial</i>	77
<i>IV.4.6 Análise das Citocinas</i>	78
<i>IV.5 Resultados referentes a vacina DTPa</i>	78
<i>IV.5.1 Ensaio clustering em células CHO</i>	78
<i>IV.5.2 Ensaio do Limulus Amebocyte Lisate (LAL)</i>	
<i>ou Ensaio de Endotoxina</i>	79
<i>IV.5.3 Edema de Pata</i>	80
<i>IV.5.4 Análise Histopatológica</i>	81
<i>IV.5.5 Leucometria Total e Diferencial</i>	83
<i>IV.5.6 Análise das Citocinas</i>	84
<i>V. DISCUSSÃO</i>	85
<i>V.1 Conteúdo de PT ativa</i>	86
<i>V.2 Conteúdo de LPS</i>	86
<i>V.3 Medida do Edema</i>	87
<i>V.4 Análise Histopatológica</i>	89
<i>V.5. Leucometria</i>	90
<i>V.6 Produção de Citocinas</i>	91
<i>VI. CONCLUSÕES</i>	93
<i>VII. REFERÊNCIAS</i>	95

## ***I. INTRODUÇÃO***

### ***I.1 A Vacina DTP: Considerações Gerais, Uso e Controle***

Apesar das vacinas figurarem como os produtos biológicos mais seguros, eficazes e com a relação “custo/benefício” mais favorável, sabe-se que uma série de efeitos adversos podem ocorrer após sua aplicação. Tais eventos ocorrem com frequência relativamente alta após o uso de algumas vacinas como é o caso da vacina contra a difteria, o tétano e a coqueluche (Vacina DTP). No caso desta vacina, a maioria destes eventos são referidos como de caráter benigno e transitório *i.e.* febre e dor local.

Reações graves são colocadas como raras, mas quando ocorrem, quase nunca, são reconhecidos os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nestas complicações. Havendo associação temporal entre a aplicação da vacina e a ocorrência de determinado evento adverso, considera-se possível a existência de vínculo causal entre os dois fatos. Torna-se portanto, de caráter fundamental e indispensável uma avaliação laboratorial que propicie uma busca rigorosa do diagnóstico etiológico, com a finalidade de se entender se o evento adverso, a seqüela, ou mesmo o óbito possam ser atribuídos à vacina. No entanto, na maioria das vezes, não dispomos de um modelo de estudo que possa evidenciar a relação causal entre a vacina e o evento adverso, ou mesmo a relação entre o ensaio laboratorial e a ocorrência do evento em campo (M.S., 1988).

A vacina que é o objeto de nosso estudo, mundialmente conhecida como vacina tríplice bacteriana ou vacina DTP, esteve no centro de controvérsias sobre avaliação e comercialização de vacinas para crianças pelo menos desde a última metade do século XX. Estas controvérsias, demonstram transcender os limites da pesquisa científica, redefinindo relações complexas entre a indústria, o governo, leis e direitos do consumidor, pelo menos no que se observa principalmente na história ocorrida nos Estados Unidos da América.

Os efeitos colaterais perigosos provocados por esta vacina são conhecidos há cinco décadas e pelos menos há quatro delas se tem empregado esforços na obtenção de uma alternativa mais segura e, mesmo decorrido todo este tempo em pesquisas, esta alternativa mais segura somente se tornou viável na década de 1990, com o surgimento da vacina conhecida como DTP acelular.

O fato é que este produto biológico (vacina DTP) faz parte de um grupo de vacinas recomendado e amplamente utilizado no Programa Ampliado de Imunizações da Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo a sua aplicação indicada a toda

população mundial menor de 5 anos. Esta preparação tem um importante papel em saúde pública no controle de três doenças: a difteria, o tétano e a coqueluche que são especificamente preveníveis pela imunização. A eficiência da proteção conferida por esta vacina se baseia na produção de anticorpos aos antígenos pertussígenos (como a toxina pertussis, os filamentos de hemaglutinina, os lipopolissacarídeos) e aos toxóides tetânico e diftérico.

As vacinas atuais contra a coqueluche são produzidas a partir de uma ou mais cepas de *B. pertussis* que devem possuir os aglutinogêneos 1, 2 e 3. O processo de produção compreende as etapas de cultivo, inativação, padronização da concentração (ajuste opacimétrico), prova de potência e prova de toxicidade. Logo a seguir, a vacina sofre um processo de adsorção a um adjuvante (hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio) e a combinação com toxóides tetânico e diftérico, obtendo-se assim a vacina DTP adsorvida, definição esta, utilizada pela OMS em 1985 (WHO,1985).

Os ensaios aplicados ao controle da vacina DTP correspondem a dois tipos de ensaios de toxicidade: 1. o ensaio de toxicidade propriamente dito, conhecido como toxicidade inespecífica, toxicidade anormal ou teste de inocuidade e 2. os ensaios de toxicidade específica, que normalmente são aplicados durante o processo de produção.

O primeiro, toxicidade inespecífica, é utilizado para verificar a presença de elementos estranhos ou indesejáveis que possam aparecer na vacina, devendo o produto apresentar-se não tóxico para este ensaio. Neste ensaio, uma dose da vacina é inoculada em camundongos e cobaias e por um período de sete dias observa-se se há o aparecimento de sinais tóxicos, que segundo a OMS e algumas Farmacopéias são evidenciados pelo aparecimento de perda de peso ou morte dos animais envolvidos.

Os testes ditos específicos são utilizados para detectar propriedades potencialmente perigosas relacionadas a certas vacinas, como por exemplo:

- habilidade dos toxóides diftérico e tetânico se reverterem para toxina,
- possibilidade de produção de bacilo virulento na BCG,
- possibilidade de vacina contra poliomielite causar neurovirulência.

Para a vacina DTP de células inteiras, a toxicidade específica vem sendo controlada pelos seguintes ensaios:

1. Ensaio de ganho de peso em camundongos ou toxicidade específica para o componente pertussis (WHO, 1990), que é dependente da observação, a partir da inoculação intraperitoneal da vacina em camundongos, de uma perda de peso sofrida pelos animais nas primeiras 24h seguidas de um aumento de peso e recuperação dos

animais dentro de um período de sete dias (Cameron, 1976). O grupo tratado com a vacina teste é comparado com um grupo controle ao qual se inoculou solução salina.

2. Ensaio de toxicidade específica para os componentes diftérico e tetânico (WHO, 1990) .
3. Ensaio para verificação da irreversibilidade da toxicidade para os componentes diftérico e tetânico (Cameron, 1976; WHO, 1990).

Estes ensaios, segundo a OMS, devem fornecer informações sobre a segurança e a qualidade da vacina produzida, sendo seus resultados um indicativo de que a vacina esta pronta para o uso. Dentre estes, a toxicidade específica para o componente pertussis tem sido um ensaio, aplicado não somente no processo de produção mas também no produto final, pois a maioria dos eventos adversos são atribuídos ao componente pertussis da vacina DTP. Por isso, a OMS não tem baseado suas recomendações somente nestes ensaios; tem recomendado a utilização de ensaios complementares onde a avaliação dos efeitos tóxicos relacionados ao componente pertussis possam ser melhor compreendidos e que venham a contribuir para uma maior segurança em relação ao uso da vacina (WHO, 1990).

A OMS alerta ainda as autoridades de controle e aos produtores, a observarem que o resultado obtido com relação ao ensaio de ganho de peso depende não somente de fatores relacionados à vacina, como também às cepas dos animais utilizados e de suas condições de manutenção. Chama a atenção ainda, ao fato de que com este ensaio e com o ensaio de toxicidade inespecífica, pouca informação pode ser obtida para se avaliar a relação entre a toxicidade da vacina em animais e a ocorrência de reações adversas com a vacinação em humanos (WHO, 1990).

Esta preocupação com as reações adversas está respaldada na observação de ocorrências associadas ao uso da vacina DTP. Tal fato tem levado vários pesquisadores a publicarem trabalhos científicos que buscam propor, avaliar e padronizar novos ensaios que possam fornecer um conjunto maior de informações sobre a qualidade e segurança desta vacina.

Atualmente poucos são os países que têm aplicado ensaios complementares ao controle da vacina DTP. A Inglaterra, o Japão e a Holanda são exemplos de países que vêm trabalhando no sentido de desenvolver ou aplicar ensaios que forneçam informações relevantes sobre a segurança da desta vacina. Alguns destes ensaios encontram-se descritos em Requerimentos ou Recomendações Especiais, como o JMR,1973 (Japanese Minimum Requirements for Biological Products) e WHO 1990.

É importante ressaltar, que normalmente no processo produtivo de uma vacina, se procura obter o maior grau possível de proteção (eficácia), com um menor grau possível de reatogenicidade (inocuidade). Antes de sua liberação para uso, o produto deve cumprir três fases de estudos como recomendado pela OMS, que podem levar cerca de dez anos para sua conclusão. Após a fase III, onde já podem ter decorridos oito anos de estudos, cerca de dois anos são ainda devotados a revisão por parte das autoridades nacionais de saúde pública, dos estudos do produto e da documentação apresentada para o registro. Mas, mesmo após o registro de sua fabricação e distribuição em larga escala, um sistema de vigilância para os eventos adversos deverá ser mantido (M.S., 1988).

## ***1.2 A coqueluche e os fatores de virulência da *Bordetella pertussis****

A coqueluche é uma doença não invasiva, altamente contagiosa do trato respiratório humano e particularmente severa em crianças na primeira infância (recém-nascidos). A doença pode assumir características de suma gravidade, levando ao óbito pelas possíveis complicações (Carrada, 1982; Veronesi, 1999). A coqueluche é causada por um patógeno humano, a *Bordetella pertussis*, um coco-bacilo Gram-negativo, originalmente isolado em 1906 por Bordet e Gengou (Bordet, 1906). Atualmente, é considerada uma síndrome (síndrome pertussis) podendo ser causada por vários agentes como *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella broncheseptica* e Adenovírus (tipo 1, 2, 3 e 5) entretanto, apenas a *Bordetella pertussis* está associada com as coqueluches endêmica e epidêmica e com as complicações que podem levar a morte (Moreno & Diaz, 2000).

Esta doença é caracterizada por broncopneumonia, tosse paroxística e um chiado típico na respiração quando o ar é inspirado. É uma doença de grande prevalência em países em desenvolvimento, onde a falta de assistência médica e medicamentos como antibióticos favorecem a progressão da doença. É uma doença de natureza transmissível e sua severidade nestes países tem provocado a morte de aproximadamente 346.000 crianças em todo o mundo (WHO, 1999). Mundialmente, a coqueluche é a terceira causa de morte entre as doenças imunopreviníveis (Ivanoff *et al.*, 1997). Atualmente, países desenvolvidos deparam-se com a reemergência da coqueluche (DAS, 2002), Figuras 1 e Quadro 1. Nesses países, a imunização em massa de crianças com a vacina DTP celular reduziu a incidência e mortalidade entre crianças até quatro anos de idade. Visto que a imunidade adquirida artificialmente não é duradoura, as altas taxas de

cobertura vacinal determinaram uma mudança no padrão da infecção. Hoje em dia, além de atingir as crianças ainda não completamente imunizadas, a coqueluche afeta também as crianças vacinadas maiores de quatro anos de idade, adolescentes e adultos (Edwards *et al.*, 1999), Figuras 2 e 3.

Figura 1



Quadro 1

Número de casos confirmados de coqueluche.  
Brasil e grandes regiões – 1991 a 1999.

Região	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999
<b>Brasil</b>	<b>7.252</b>	<b>5.155</b>	<b>5.388</b>	<b>4.098</b>	<b>3.798</b>	<b>1.245</b>	<b>1.789</b>	<b>1.337</b>	<b>1.369</b>
Norte	571	352	760	459	252	95	938	433	386
Nordeste	3.541	1.959	1.500	1.411	1.951	645	377	178	356
Sudeste	1.183	1.333	1.344	702	693	206	155	247	249
Sul	1.101	832	1.193	1.065	424	136	4	212	216
Centro-Oeste	856	679	591	461	478	163	315	267	162

Fonte: Ministério da Saúde/Cenepl; base de dados do Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica

Figura 2

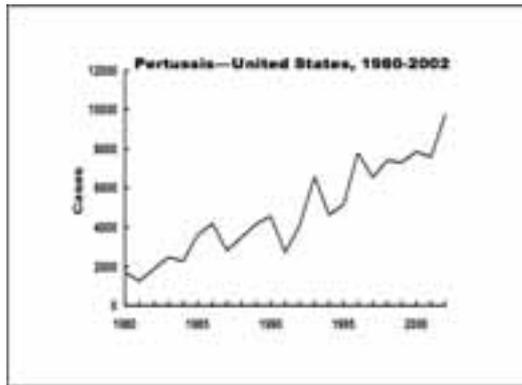


Figura 2. Incidência da Coqueluche nos EUA. Fonte CDC. Webarquive.

Figura 3

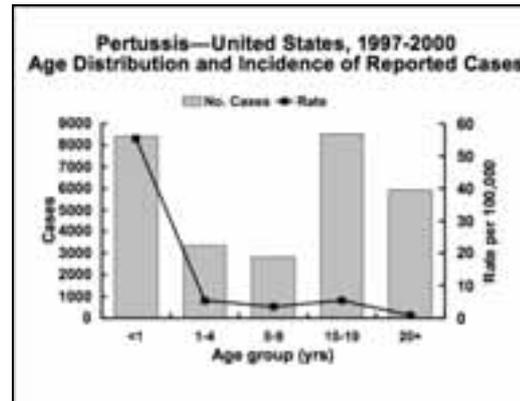


Figura 3. Distribuição da Incidência da coqueluche nos EUA, por faixa etária. Fonte CDC. Webarquive.

O curso natural da infecção começa com a bactéria sendo introduzida no hospedeiro pelo ar contendo gotículas de saliva de um indivíduo infectado. O patógeno procede a colonização do trato respiratório aderindo-se as células do epitélio ciliado da traquéia e da nasofaringe. Uma vez promovida a aderência, a bactéria inicia a replicação e a colonização das áreas adjacentes. A proliferação bacteriana é localizada e não invasiva e neste aspecto, proporciona um foco ou colônias de bactérias a partir da qual toxinas se dispersam causando mudanças fisiopatológicas que podem estar distantes do sítio de infecção podendo sua ação se manter por um tempo, mesmo depois que a bactéria tenha sido eliminada, Figura 4. Devido a este aspecto, Pittman definiu esta doença como uma toxi-infecção análoga a difteria e ao tétano (Pittman, 1979 e 1984).

As toxinas secretadas pelo microrganismo promovem dano na linha do epitélio resultando em perda das células ciliadas o que induz uma tosse característica (daí a denominação pertussis, que significa tosse longa ou comprida). Estas toxinas também auxiliam a bactéria a evadir a resposta imune do hospedeiro interferindo com os mecanismos de limpeza. Paralisação da função dos cílios, desregulação no sistema sinalizador das proteínas G do hospedeiro e inibição da função da resposta imune celular pela regulação positiva dos níveis de AMPc são exemplos dos danos causados pelas várias toxinas da *B. pertussis*.

Figura 4

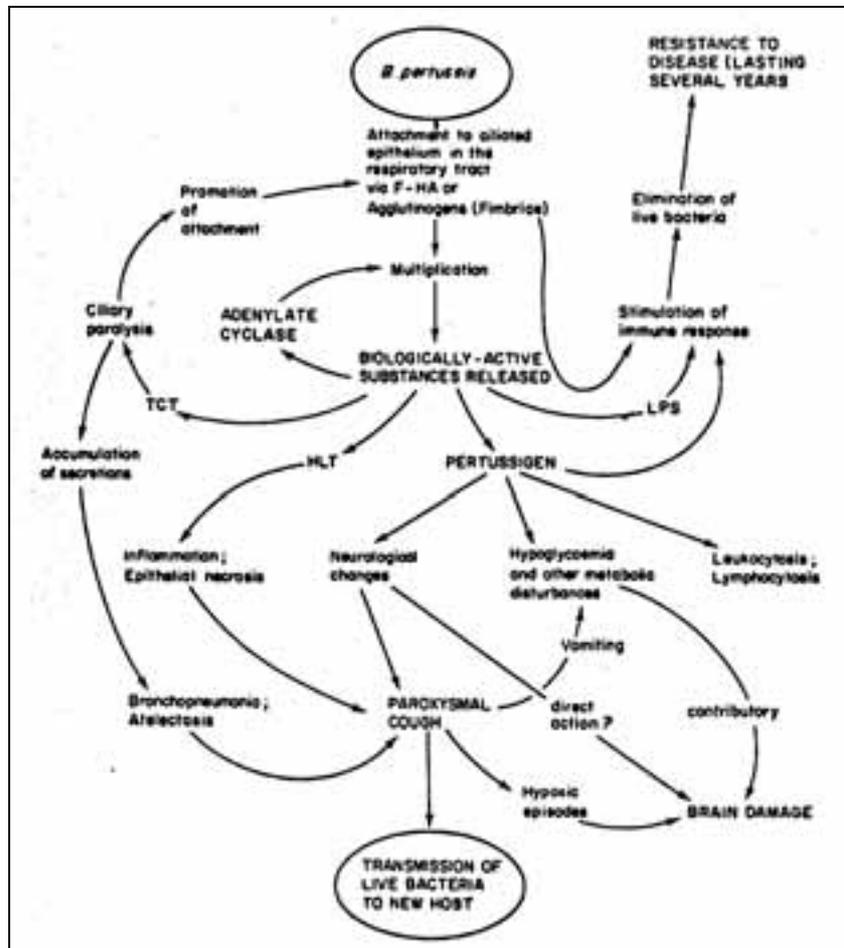


Figura 4. Possíveis papéis das substâncias biologicamente ativas produzidas pela *B. pertussis*. Contribuição dessas substâncias na patogênese da coqueluche e subsequente imunidade; FHA: Hemaglutinina Filamentosa; HLT: Toxina Termo-lábil; LPS: Lipopolissacarídeo; TCT: Citotoxina traqueal. Baseado no diagrama de Olson (1975). Extraído de *Medical Microbiology v.2. Immunization Against Bacterial Disease*, p.221. Academic Press, 1983.

A incidência da coqueluche teve uma grande redução com o advento da vacina pertussis em 1940, também conhecida como “whole-cell” ou vacina de células inteiras, constituída de células inteiras de *B. pertussis* tratadas quimicamente ou inativadas pelo calor. Esta vacina, que passou a fazer parte dos programas de imunização é conhecida como vacina DTP (vacina contra a difteria, o tétano e a coqueluche) e demonstrou ser extremamente eficaz na prevenção dos sintomas da coqueluche. Os componentes tetânico e diftérico da vacina, comparativamente, tem atraído pouca controvérsia à reputação da vacina. Pesquisas têm sido conduzidas na intenção de trazer uma melhor compreensão do componente pertussis e de se desenvolver uma vacina com constituintes menos reatogênicos.

### ***1.3 O Gênero Bordetella***

A bactéria classificada atualmente dentro do gênero *Bordetella*, teve uma existência taxonômica dinâmica, não tendo sido sempre classificada neste gênero. Foi Lopez quem propôs que um novo grupo, o gênero *Bordetella* fosse criado como uma casa ou taxon para três espécies: *pertussis*, *parapertussis* e *bronchiseptica* (Lopez, 1952). As evidências moleculares mais recentes, incluindo análise de seqüências de DNA, eletroforese de isoenzimas e tipagem por PCR, justificam o agrupamento destas três espécies no mesmo gênero (Zee *et al.*, 1997) e (Arico & Rappuoli, 1987). O fato que chama atenção é que estranhamente, a *B. pertussis* é a única que está adaptada a uma simples condição e tem sido somente encontrada infectando humanos.

A *B. parapertussis* causa em humanos uma coqueluche mais branda e tem sido encontrada associada com infecções respiratórias em ovinos (Cullinane *et al.*, 1987). A *B. bronchiseptica* coloniza a maioria dos outros mamíferos, causando doenças que tem implicações comerciais (Goodnow, 1980), sendo a mais importante a que está associada a rinite atrópica em suínos, que trás perdas consideráveis as indústrias, podendo também atacar canídeos (Switzer, 1956; Thompson *et al.*, 1976). A *B. avium*, patógeno das aves foi adicionada recentemente ao gênero (Gross *et al.*, 1989). Causa doenças respiratórias em determinados tipos de galináceos (Kersters *et al.*, 1984).

Recentemente novas espécies têm sido propostas para este gênero. *B. hinzii* é o nome que assinala uma nova espécie isolada de bacteremias de indivíduos com AIDS (Cookson *et al.*, 1994). Associada com a septicemia humana, outra espécie, designada *B. holmensii* também foi identificada (Weyant *et al.*, 1995). O nome *B. trematum*, foi recentemente proposto para novas espécies isoladas de ferimentos e infecções do ouvido

(Damme *et al.*, 1995). Embora nenhuma dessas espécies estejam associadas com infecções do trato respiratório, elas são similares a outros membros do gênero baseado em análises filo genéticas (Cookson *et al.*, 1994; Damme *et al.*, 1996). Desde sua descoberta, *B. hinzii* tem sido isolada do trato respiratório de espécies de galináceos infectados (Damme *et al.*, 1995).

#### ***I.4 Fatores de Virulência da B. pertussis***

O produto dos genes expressos pela *B. pertussis* no momento que ela invade e persiste no hospedeiro recebe a terminologia de fatores de virulência ou determinantes de virulência. Estes incluem adesinas que facilitam a aderência ao hospedeiro e toxinas capazes de evadirem as defesas do organismo, Quadros 6 e 7. Estudos de mutagênese tem demonstrado que estas adesinas e toxinas são importantes para a persistência da bactéria em modelos *in vivo* (Gross *et al.*, 1992; Weiss & Goodwin, 1989). Estes estudos favoreceram a idéia de que a estratégia para o desenvolvimento de vacinas contra a coqueluche, significa incluir poucos imunógenos em vacinas chamadas acelulares multi-componentes. Muitos dos fatores de virulência descritos a seguir têm sido considerados como candidatos à antígenos vacinais; incluem-se entre eles: Hemaglutinina Filamentosa (FHA), Fímbrias soro tipo-específicas (Aglutinogênios - Agg- 2 e 3), Pertactina (69KDa), Toxina Pertussis (PT) e Toxina Adenilato Ciclase (Ac). Outros determinantes de virulência também têm sido considerados: Toxina Dermonecrótica (DNT) ou Termo-Lábil (HTL), Citotoxina Traqueal (TC), Lipopolissacarídeo (LPS), Fator de Colonização Traqueal (Tcf) e Proteínas do Locus da Soro-Resistência (brK).

Fator de Virulência	Regulação pelo bvg
<b>Fatores de Adesão</b>	
Hemaglutinina Filamentosa	+
Pertactina	+
Fímbrias	+
Toxina Pertussis	+
Fator de Colonização Traqueal*	+
<b>Fatores de Citotoxicidade</b>	
Citotoxina traqueal	-
Toxina Adenilato Ciclase	+
Toxina Pertussis	+

\* possível molécula de adesão  
bvg = sistema de sinalização

**Quadro 3**  
**Componentes da *B. pertussis* e seus possíveis papéis na patogênese da enfermidade e na imunidade**

Papel	Toxina Pertussis	Hemaglutinina Filamentosa	Aglutinogênios	Pertactina	Adenilato Ciclase	Citotoxina Traqueal
<b>Adesão</b>	!!	!!	0	!	0	0
<b>Citotoxicidade</b>	!!	0	0	!	!!	!
<b>Imunidade</b>	!!	!!	!	!	?	0

!! : provavelmente importante  
 ?: importância desconhecida

! : possivelmente importante  
 0: não importante

#### I.4.1 Hemaglutinina Filamentosa (FHA)

A etapa crítica na infecção causada pela *B. pertussis* é a adesão do patógeno às células do hospedeiro. A Hemaglutinina Filamentosa é referida como a principal adesina desta bactéria. É uma proteína de 220-kD associada a superfície secretada para o ambiente extracelular para facilitar a aderência às células ciliadas do epitélio respiratório, que dá início ao ciclo patogênico. Estes filamentos também podem trabalhar como uma ponte de adesina, facilitando a adesão de outros micro-organismos (Tuomanen, 1985). Isto pode por sua vez explicar as superinfecções que complicam o curso clínico da coqueluche.

Os domínios diferentes desses filamentos abrangem várias capacidades de ligações, incluindo a adesão aos fagócitos mediados por integrinas, ligação às lectinas mediadas aos açúcares sulfatados encontrados na matriz extracelular (ECM) e em células epiteliais, e um domínio de reconhecimento de carboidratos que permite a adesão às células ciliadas presentes no epitélio respiratório (Tuomanen & Weiss, 1985).

#### I.4.2 Fímbrias (Agg)

As fímbrias são filamentos extracelulares de proteínas que são encontrados na maioria das espécies bacterianas. Também são conhecidos como pili ou aglutinogênios. São protusões filamentosas longas que se estendem da superfície da bactéria capacitando a ligação a receptores particulares, tendo um importante papel na colonização do hospedeiro (De Graaf *et al.*, 1986; Steven *et al.*, 1986).

A *B. pertussis* produz dois tipos distintos de fímbrias que foram primeiramente identificados como aglutinogênios; sorotipo 2 e sorotipo 3 (também conhecido como sorotipo 6).

#### I.4.3 Pertactina (69-kDa)

Também conhecida como p.69 e OMP 69 devido a sua mobilidade eletroforética, a pertactina é atualmente uma outra proteína 60-KDa envolvida na aderência bacteriana (Leininger *et al.*, 1991; Makoff *et al.*, 1990). Produtos similares são encontrados na superfície da *B. parapertussis*, p.70 (Dougan *et al.*, 1991) e na *B. bronchiseptica*, p.68 (Montaraz *et al.*, 1985).

Não se conhece os mecanismos pelos quais a pertactina se adere as células eucarióticas nem tampouco foi encontrado algum receptor. Acredita-se que proteínas como fibronectina e vitronectina facilitam a ligação desta proteína às células de mamíferos (Hynes, 1987; Hynes, 1992).

A descoberta desta proteína aconteceu quando uma análise das vacinas acelulares produzidas pela Indústria Química Takeda Ltda, em Hikai, Japão mostraram a presença de traços de aglutinogênios e quantidades significantes desta proteína que foi descrita como 69-KDa ou OMP como já descrito acima.

Sua identificação na *B. pertussis* e as pesquisas sobre suas funções iniciaram-se quando sua presença foi relatada na *B. bronchiseptica* (Montaraza *et al.*, 1985) a qual confiria imunidade protetora em animais susceptíveis (Novotny *et al.*, 1985). Esta proteína também é identificada como aglutinogênio (Breman *et al.*, 1983).

#### I.4.4 A Toxina Pertussis (PT)

A PT é uma proteína globular obtida de sobrenadantes de cultivo de *B. pertussis*. É uma exotoxina do tipo A - B. A subunidade A é enzimaticamente ativa e composta por uma unidade chamada S1. O oligômero ou subunidade B é responsável pela união da toxina à superfície das células eucarióticas. Desta forma a subunidade A pode penetrar no interior das células do hospedeiro. A subunidade B é composta de outras cinco subunidades (S2, S3, duas S4, S5). Na ausência da subunidade A, a subunidade B aglutina eritrócitos e estimula a mitose dos linfócitos. A subunidade A cataliza a ADP-ribosilação de proteínas G. Na ausência do substrato proteico esta subunidade cataliza a hidrólise do NAD a ADP-ribose e nicotinamida. Acredita-se que a atividade ADP-ribosiltransferase desta toxina seja responsável por efeitos biológicos diversos tanto *in vivo* como *in vitro*. Por exemplo, a ADP-ribosilação da proteína que se liga a GTP, chamada Ni, pode alterar a capacidade da célula a responder a hormônios que inibem a produção de AMPc ou a movimentação de cálcio. Esta desregulação no sistema de

sinalização celular tanto do epitélio como do sistema imune pode alterar o sistema de regulação das proteínas G (Katada & Ui, 1983).

#### 1.4.5 Atividades Biológicas da Toxina Pertussis

As observações de Parfentjev e Goodline em 1948 e Greenberg e Fleming em 1949 marcaram o início de numerosas investigações sobre as atividades biológicas da vacina pertussis. Greenberg e Fleming demonstraram o aumento da produção dos anticorpos produzida pelo estímulo do antígeno, enquanto Parfentjev e Goodline descreveram o aumento da susceptibilidade à histamina de camundongos tratados com a vacina pertussis. Logo nas primeiras pesquisas, foi encontrado um aumento da susceptibilidade de camundongos à anafilaxia, à serotonina, à combinação de histamina e serotonina, endotoxina e outros agentes choque – sensibilizantes. Outro achado interessante é que a vacina demonstrava um profundo potencial de ação sobre a produção de anticorpos IgE. A vacina também promovia a indução de encefalomielite experimental alérgica (EAE) em camundongos e ratos; induzia marcada leucocitose com predominância de pequenos linfócitos e aumento da produção de insulina em ratos e camundongos (Munoz, 1985).

Quando se iniciaram as investigações sobre a *B. pertussis* em 1953 os pesquisadores já sabiam que teriam muito trabalho para desenvolver uma vacina com pouca reatogenicidade. Para tal, teriam que separar o chamado antígeno protetor (MPA) do fator sensibilizante a histamina (HSF), da endotoxina (LPS) em camundongo e da toxina dermonecrótica (DNT). Quando obtiveram o HSF razoavelmente puro, chamaram-no de pertussigen que significava: substância pertussis-indutora, para distingui-lo de outras toxinas e antígenos da *B. pertussis*. Mais tarde foi adotado o nome proposto por Pittman: toxina pertussis (PT) (Munoz, 1985).

A análise do Quadro 8, evidencia que a toxina pertussis é capaz de modificar muitas respostas imunes, como: aumento da produção de anticorpos (modulação) para um determinado antígeno dado, promover reações de hipersensibilidade imediata ou tardia, aumento da indução de doenças auto-imunes, produção de marcada leucocitose com predominância de linfócitos e inibição da migração de macrófagos para áreas de inflamação. A vacina pertussis também afeta muitas outras funções que podem estar envolvidas na resposta imune (Morse, 1965; Munoz & Bergman, 1968, 1977; Wardlaw & Parton, 1983).

Quadro 4

Principais atividades da PT <i>in vivo</i>	
Atividade	Dose requerida em ng
HSF	0,5
Aumento da permeabilidade de capilares em músculo estriado	0,5
Leucocitose e Linfocitose	8 a 40
Aumento de secreção da insulina	2
Imunopotencialização:	
IgE	0,1
IgG1	10
Anafilaxia	9,5
EAE* (ratos)	20
EAE (camundongos)	250
Letalidade	546
Redução da migração de macrófagos do peritônio	80
Elevação do GMP cíclico cerebelar (ratos)	25000
Proteção dos camundongos com PT detoxificada	1700

\*EAE – Encefalomielite Experimental Alérgica

#### I.4.6 Adenilato Ciclase ou Hemolisina (Ac)

A adenilato ciclase da *B. pertussis* é uma toxina bi-funcional, pertencente a família das toxinas RTX (*repeat toxin*). Este grupo inclui as alfa hemolisinas de *E. coli*, junto com as hemolisinas e leucotoxinas de vários patógenos Gram-negativos incluindo *Pasteurella haemolytica* e espécies *Actinobacillus* (Welch, 1991). Ambas as atividades, de adenilato ciclase e hemolítica tem sido demonstradas como essenciais no início do processo infeccioso da *B. pertussis*. (Khelef *et al.*, 1992)

Embora a adenilato ciclase tenha uma alta afinidade com a calmodulina, provavelmente estando envolvida na translocação da toxina para dentro das células do hospedeiro, recentes estudos tem evidenciado que isto não é verdadeiro ou correto (Heveker & Ladant, 1997).

A invasão das células do hospedeiro pela adenilato ciclase/hemolisina não é efetuada através de uma via endocítica mediada por receptor. Possivelmente é utilizado um sistema de entrada especializado cálcio e temperatura dependente, ainda não inteiramente compreendido (Gordon *et al.*, 1989).

#### I.4.7 Toxina Dermonecrótica (DCT) ou Toxina Termo-Lábil (HLT)

Embora conhecida por muitos anos esta toxina não foi extensivamente estudada como os outros determinantes de virulência da *B. pertussis*. Em parte, a razão para isto se deve a dificuldade do processo de purificação, pois é uma toxina termo-lábil que é inativada a 56 °C.

Seu nome deriva da habilidade de causar lesões necróticas na pele quando injetada subcutaneamente em camundongos (Iida & Okonogi, 1971; Livey & Wardlaw, 1984) sendo letal quando administrada por via intravenosa. É produzida por todas as espécies do gênero *Bordetella*, não sendo secretada para o meio extracelular, mas estando localizada no citoplasma.

#### 1.4.8 Citotoxina Traqueal (TC)

A maior atividade biológica desta toxina é sua habilidade de promover danos às células do tecido epitelial respiratório (Cookson, 1989). Foi um dos últimos componentes tóxicos descobertos da *B. pertussis*. É uma exotoxina com 921 Daltons sendo o menor produto bacteriano conhecido gerador de efeitos citopatológicos. É derivada de um peptídeoglicano, parecido com a maioria das macro moléculas deste tipo dos procariontes. Possui uma atividade marcadamente seletiva: é responsável por danos específicos em células ciliadas, desabilitando uma barreira e um mecanismo de defesa primária nos pulmões. Os evidentes episódios de tosse tão característicos da coqueluche constituem-se de uma ação desesperada do organismo, desencadeada com a finalidade de limpar o acúmulo de muco, bactérias e produtos inflamatórios estagnados no caminho do ar, devido a ciliostase. (Goldman, 1988; Luker *et al.*, 1995).

A toxicidade conferida por esta toxina é indireta, é primeiramente causada por induzir as células do hospedeiro a produzir interleucina-1 (Heiss *et al.*, 1993). Isto ativa as células do hospedeiro a sintetizar óxido nítrico o que conduz a níveis elevados de radicais óxido nítrico (Heiss *et al.*, 1994). Não está ainda absolutamente certo se é a citotoxina traqueal ou a interleucina-1 que estimula a síntese do óxido nítrico. O óxido nítrico age destruindo enzimas ferro-dependentes, eventualmente inibindo a função mitocondrial e a síntese do DNA em células próximas vizinhas do hospedeiro (Heiss, 1993).

As células do tecido epitelial são as que mais sofrem danos quando da aderência da *B. pertussis*, mas a citotoxina traqueal também tem efeito sobre outras células, como sobre os neutrófilos, danificando suas funções em concentrações baixas e conferindo-lhes atividade tóxica em concentrações mais altas (Cundell *et al.*, 1994).

#### 1.4.9 Lipopolissacarídeo (LPS)

Presente na maioria das bactérias Gram negativas o LPS geralmente compõe-se de um lipídio A e um longo polissacarídeo denominado antígeno O. A molécula do LPS da *B. pertussis* é menor do que o LPS de outras bactérias, diferindo sua estrutura pela falta do antígeno O. Normalmente é referido como um lipooligossacarídeo, sendo a *B. pertussis* produtora de dois tipos de LPS: A e B (Peppler, 1984).

O papel desempenhado pelo LPS na patogênese da infecção produzida pela *B. pertussis* não é claro, entretanto as atividades biológicas induzidas por este componente incluem propriedades antigênicas e imunomoduladoras, (Amano *et al.*, 1990) e (Chaby & Caroff, 1988) sendo a atividade mais comumente associada, como uma potente atividade de endotoxina (Chaby & Caroff, 1988). O conhecimento do LPS produzido pela *B. pertussis* permanece limitado e pesquisas adicionais são necessárias antes que possamos definir a participação desta molécula na patogênese da doença causada por esta bactéria, e como adjuvante na imunidade das vacinas utilizadas contra a coqueluche.

#### 1.4.10 Fator de Colonização traqueal (Tcf)

Este fator foi descoberto a partir de trabalhos com cepas mutantes deficitárias em quatro OMPs (Schmidt *et al.*, 1999).

Ainda não foi elucidada o exato papel desta proteína na patogênese da coqueluche. Alguns autores sugerem que ela tem um processo de maturação compartilhado com o da proteína 69-KDa (Finn & Stevens, 1995).

#### 1.4.11 Proteínas do Locus da Soro Resistência (brk locus)

O brk locus possui homólogos nas espécies *parapertussis* e *bronchiseptica*, e consiste de dois gens; brkA e brkB (Fernandez & Weiss, 1994). São responsáveis pela produção de duas proteínas; 103 KDa e 32 kDa respectivamente, as quais são importantes para o que se chamou de soro resistência (Finn & Stevens, 1995). São proteínas similares a pertactina, por isso possivelmente desempenham também um papel na aderência e na invasão da bactéria.

Recentes estudos demonstraram que isolados de *B. pertussis* eram soro resistentes, sugerindo que esta capacidade confere uma vantagem *in vivo* na circulação

das cepas, pois isto possibilita uma completa evasão da atividade de defesa do hospedeiro, a qual poderia ser letal para a bactéria. Foi também demonstrado que estas cepas carregavam uma cópia extra do locus *brk*, exibindo níveis aumentados de soro resistência (Fernandez & Weiss, 1998).

## ***1.5 A Vacina contra Coqueluche***

### *1.5.1 As primeiras pesquisas (1906 a 1930)*

O desenvolvimento da vacina contra coqueluche, segundo Manclarck e Cowell (1984), teve uma apreciação totalmente empírica e seu início se deu quando se cultivou em laboratório o agente etiológico da doença: a *Bordetella pertussis*.

Este cultivo foi desenvolvido em 1906 por Jules Bordet e Octave Gengou do Instituto Pasteur de Bruxelas depois de mais de 20 anos de trabalhos desenvolvidos por diversos grupos de investigadores (Bordet *et al.*, 1906).

O desenvolvimento desta técnica levou a uma série de pesquisas empíricas na tentativa de produzir uma vacina contra a coqueluche através do cultivo da bactéria em placas contendo o meio B-G ágar (Ágar Bordet - Gengou) inativando-se a bactéria por procedimentos físicos ou químicos. Este meio passou a ser utilizado a partir de 1912 por vários pesquisadores como: Charles Nicolle do Instituto Pasteur de Tunis em 1913 e Thorvald Madsen do Instituto Soroterápico Estadual da Dinamarca, em 1914, além de outros (Chase,1982).

O primeiro dos desafios com que estes pesquisadores se depararam foi o de estabelecer a eficácia da vacina produzida, uma prova que se apresentava complicada, pelos seguintes fatos: 1. uma porção significativa da população mostrava-se imune a infecção; 2. não existiam laboratórios ou testes em animais que pudessem avaliar como as novas vacinas se comportariam; e, 3. a toxicidade era difícil de ser avaliada devido à falta de conhecimento da comunidade científica sobre a natureza da vacina. Assim, todas as vacinas produzidas na época caíam em uma destas considerações: algumas pareciam prevenir a doença, mas apresentavam toxicidade elevada; outras eram tão tóxicas que não poderiam ser utilizadas em estudos clínicos; finalmente existiam aquelas não tóxicas que não se sabia se seriam capazes de prevenir a doença (Sill,1913).

Apesar destas dificuldades, em 1914 esta vacina foi incluída na lista de Remédios Novos e Não Oficiais da Associação Médica Americana (AMA) pois haviam seis produtores americanos.

Este documento constituía-se de uma lista de tratamentos publicada pela AMA, os quais poderiam ser eficazes, apesar desta eficácia não ter sido comprovada por nenhum trabalho. A vacina pertussis foi removida desta lista em 1913 por causa dos resultados equivocados sobre sua eficácia, mas foi readmitida em 1944. Na realidade, o que se sabe é que várias supostas vacinas foram usadas esporadicamente em testes não formais entre 1914 e 1925 (Felton & Willard, 1940).

Madsen em 1925 e mais tarde em 1933, foi o primeiro a publicar os resultados de ensaios clínicos utilizando a vacina pertussis de células inteiras durante uma epidemia de coqueluche entre 1923 e 1924 nas ilhas Faroe no Mar do Norte. Em seu experimento, um exame cuidadoso foi realizado entre os indivíduos vacinados e não vacinados que tinham sido expostos à doença. Pela primeira vez, os resultados foram encorajadores, o que levou a idéia do estabelecimento do uso da vacina como um instrumento de proteção contra a doença, apesar das evidências na época, indicarem que trabalhos adicionais seriam necessários para o desenvolvimento de uma vacina mais efetiva. Especificamente, os estudos realizados nesta época, demonstraram que ambos os grupos de indivíduos, vacinados e não vacinados, desenvolveram a doença em algum grau, mas dentre os vacinados a manifestação da doença foi mais branda e com poucas mortes. Em 1929 ocorre outro surto de coqueluche nas ilhas Faroe. Madsen demonstrou então que a vacina poderia ser utilizada para prevenir a doença, apesar da pouca informação obtida dos ensaios realizados com pequenos grupos de crianças sem a utilização de grupos controles. Simplesmente acreditava-se que a vacina poderia ser efetiva (Parish, 1965).

Neste estudo, Madsen preparou vacinas com isolados frescos de *B. pertussis* crescidas em meio B-G adicionado de sangue de cavalo e inativadas pelo calor. A vacina obtida produziu um decréscimo de mais de vinte por cento na ocorrência da coqueluche quando comparados os indivíduos vacinados e não vacinados. Adicionalmente, como um estudo prévio, Madsen relatou que os sintomas desenvolvidos pelos indivíduos vacinados foram de menor severidade do que daqueles que desenvolveram a doença. Embora com o sucesso destes estudos prévios na ajuda contra dois surtos de coqueluche, Madsen em 1933 publicou um trabalho onde relatava a ocorrência de dois óbitos dentro do período de quarenta e oito horas da vacinação (Madsen, 1933).

É importante ressaltar que neste momento não existiam métodos apropriados que pudessem avaliar a capacidade imunogênica (potência) e a toxicidade destas vacinas antes de seu uso. O fato é que até 1931 não se tinha idéia da importância desta

vacina para a profilaxia da coqueluche, o que levou então a sua retirada da lista da Associação Médica Americana (Pittman, 1956).

Nesta mesma época, pesquisadores ingleses (Leslie & Gardner em 1931) mostraram o caminho para o desenvolvimento de vacinas efetivas com a descoberta de que a *B. pertussis* apresentava quatro formas distintas ou fases antigênicas de desenvolvimento.

Observaram que apesar do microrganismo ser colhido na Fase I (lisa ou virulenta), ele sofria variação quando era passado pelos meios de cultivo, o que acarretava uma mudança da fase virulenta (lisa) para uma fase não virulenta (rugosa) denominada fase IV. O organismo poderia ainda passar pelas fases II e III. Estas fases eram artificialmente definidas, mas a importância destes estudos reside na definição de que a bactéria deveria ser morta na fase I, fase apropriada para conferir uma proteção útil (Standfast, 1951).

Com esta descoberta a maioria das vacinas utilizadas passaram a ser preparadas a partir de cultivos de isolados recentes ou frescos. Mesmo com esta prática logo detectou-se uma variabilidade na eficácia destas vacinas e tal fato possivelmente era devido a uma ausência de uniformidade da antigenicidade das cepas utilizadas (Felton, 1944).

Um dos primeiros expoentes na história da vacinação nos EUA foi L.W. Sauer da “Northwestern University Medical School of Chicago”, pediatra que em seu laboratório preparou uma vacina de isolado fresco em meio Bordet-Gengou acrescido de sangue humano e em seguida inativando os organismos com fenol em lugar do calor (Eldering, 1971). Sauer recomendava a utilização de uma dose total de 75 a 100 bilhões de microrganismos, muito maior que os 22 bilhões recomendados por Madsen (Parish, 1965). Com o uso desta vacina, Sauer postulava que não havia detectado a doença (coqueluche) nas centenas de crianças que foram vacinadas entre 1928 e 1933 e, em um estudo clínico realizado em Evanston, Illinois, relata que sua vacina apresentava uma menor incidência de efeitos do que a vacina de Madsen (Sauer, 1933).

### 1.5.2 O desenvolvimento da vacina contra a coqueluche (1930 a 1940)

Em 1932, Pearl Kendrick e sua colaboradora, Grace Eldering, ambas do Departamento de Saúde Pública de Michigan - EUA, iniciaram pesquisas direcionadas para o desenvolvimento de uma vacina mais efetiva contra a coqueluche, utilizando-se

de cepas de isolados frescos de *B. pertussis* cultivadas em meio Bordet-Gengou contendo sangue de carneiro, inativando a bactéria com timerosal a temperatura de refrigeração em lugar de métodos mais drásticos como mencionados anteriormente como o uso do calor e fenol (Kendrick *et al.*, 1936).

As vacinas preparadas com o método de Kendrick demonstraram resultados positivos em ensaios clínicos apropriadamente desenhados nos EUA, em 1934. Contudo, um estudo similar conduzido em Cleveland, Ohio, por J. A. Doull, um proeminente epidemiologista, em 1936, provou que a vacinação não produziu uma proteção maior do que aquela observada em grupos não vacinados sobreviventes. Analisando estes resultados conflitantes, Kendrick, Eldering e Margaret Pittman decidiram modificar o número de bactérias na vacina. Para isso desenvolveram um método óptico conhecido como Unidades Opacimétricas, que tinha por finalidade, verificar o conteúdo de bactérias na vacina (Pitmann, 1976). Este método correlaciona o aspecto opalescente da bactéria em suspensão com a quantidade de bactérias contidas na suspensão.

A idéia de quantificar a concentração da bactéria foi mais tarde utilizada no desenvolvimento de um outro teste utilizando camundongos conhecido como Teste de Potência em Camundongos, que media a habilidade de camundongos imunizados com a vacina pertussis estarem protegidos contra uma infecção mortal pela *B. pertussis*.

Este ensaio, teria por finalidade verificar a eficácia da vacina antes de sua utilização, detectando, se a vacina seria capaz de proteger as crianças contra a doença. Este teste passou a ser conhecido como prova de potência (atualmente, também conhecido como Teste de Kendrick), e tinha como fundamento desafiar por via intracerebral com uma cepa virulenta de *B. pertussis* um grupo de camundongos previamente imunizados com diluições sucessivas de uma vacina (Kendrick *et al.*, 1947).

A determinação da eficácia da vacina utilizando-se da prova de Kendrick demonstrou uma correlação razoável entre os resultados laboratoriais e a proteção conferida pela vacina as crianças expostas à doença, como se verificou em uma série de estudos de campo organizados pelo Conselho de Investigação Médica (Medical Research Council) do Reino Unido. Este estudo concluiu que as vacinas, qualquer que fosse sua origem, que tivessem uma potência apropriada em relação a vacinas de referência adequadas, quando eram submetidas conjuntamente, a prova de Kendrick, produziam proteção adequada contra a doença (MRC, 1956; 1959).

Todos os ensaios clínicos entre 1930 e 1940, usaram este teste como uma maneira de determinar a eficácia das novas vacinas de células inteiras contra a coqueluche. O desenvolvimento de uma prova de laboratório de tal natureza assegurou a liberação de vacinas efetivas e conduziu a produção da vacina contra a coqueluche em grande escala que tornou-se em um modelo para vacinas subseqüentes (Kendrick *et al.*, 1937).

### 1.5.3 O surgimento da vacina DTP e os problemas relacionados ao seu uso (1940 a 1990)

A primeira vacina contra coqueluche como é atualmente utilizada foi proposta por Kendrick em 1942, combinando células inteiras de *B. pertussis* com os toxóides diftérico e tetânico na forma DTP, passando a ser chamada de vacina DTP. Na produção da vacina pertussis as toxinas são inativadas pela exposição do produto ao calor e estocado em ambiente frio, acrescentada de timerosal e formalina como preservativo. Esta vacina tornou-se de uso comum nos EUA sendo aplicada em todas as crianças e considerada como um “representante” para o controle da doença desde que apresentasse níveis aceitáveis de toxicidade e efetivo nível de eficácia ou funcionalidade (Kendrick, 1939).

Em 05 de janeiro de 1946 o Instituto Nacional de Saúde (National Institute of Health-NIH) enviou o teste de potência em camundongos para quarenta produtores americanos da vacina contra a coqueluche. A análise dos resultados obtidos levou então a publicação do primeiro documento contendo os Requerimentos Mínimos para a vacinação contra a coqueluche do NIH, em 1949. O uso deste teste foi aceito em 1950, dentro de uma concordância em relação a vacina pertussis de células inteiras, quando esta demonstrou uma resposta efetiva na prevenção da ocorrência de surtos epidêmicos da doença. Pesquisas de campo foram então conduzidas durante os anos seguintes, mas estas eram de caráter esporádico e apresentavam resultados amplamente variados. De uma maneira geral, a comunidade científica nesta época, aceitava que uma vacina que passasse no teste de potência em camundongos era indicada como um melhor caminho no controle da doença e que qualquer outra desvantagem não teria peso em relação aos efeitos positivos relacionados a proteção conferida pela vacina.

A eficácia da nova vacina não era o único fato relevante, mas direcionava o seu uso. Fazia-se necessário medir a toxicidade dessas vacinas, pois devia-se pensar naqueles que seriam alvos do seu uso. Assim, outra vez utilizando-se de modelos em

camundongos criou-se um teste que ficou conhecido como teste de toxicidade em camundongos. Este teste fornecia informações sobre a presença de endotoxina (Lipolissacarídeo ou LPS), sobre o Fator Promotor de Linfocitose (Lymphocytosis Promotion Factor -LPF) e sobre a Toxina Termo-Lábil (HLT). Através dele, poder-se-ia postular que mortes de camundongos logo no início do teste, indicariam a presença de resíduos ativos de HLT; perda de peso gradual nas primeiras 24 horas provavelmente indicaria o conteúdo alto de LPS; e, uma redução acentuada no ganho de peso seria uma medida do conteúdo de LPF. Devido a esta interpretação, os produtores eram obrigados a apresentar na época do pedido de registro do produto, evidências de que o método de inativação usado garantia a destoxificação da HLT na vacina pertussis (Manclarck *et al.*, 1984).

Assim, desde 1950, todas as vacinas pertussis licenciadas nos EUA deveriam passar no teste de toxicidade em camundongos. Acreditava-se que a aplicação deste teste serviria como um evidenciador da toxicidade das vacinas, já que contribuiria para a identificação da produção de vacinas altamente tóxicas antes de serem utilizadas em humanos. Infelizmente, observações em campo sobre a toxicidade destas vacinas demonstraram que existia pouca correlação entre a toxicidade produzida em humanos e o teste de toxicidade em camundongos (Barkin,1979).

Em 1961, C. N. Christensen, médico da Eli Lilly and Company®, um produtor da vacina pertussis, fez um estudo temporal, para verificar se o teste de toxicidade em camundongo serviria a sua proposta.

O resultado deste estudo foi apresentado em 1963 no “International Symposium on Pertussis”. Ele concluiu que: “ é óbvio que reações severas têm ocorrido em crianças após a imunização com a vacina pertussis as quais foram aprovadas nos teste de potência e toxicidade correntemente utilizados... Está claro que não existe correlação entre o teste de toxicidade e as reações que ocorrem nas crianças” (*apud*, Christensen, 1962).

A toxicidade da vacina pertussis se deve primeiramente ao conteúdo de duas substâncias ou fatores de virulência: a endotoxina e a toxina pertussis. A produção da vacina pertussis de células inteiras não inativa estas substâncias de maneira que a vacina apresenta algumas atividades biológicas tóxicas como as que ocorrem na doença.

Geier e colegas demonstraram em 1978 que o conteúdo de endotoxina da vacina pertussis poderia ser detectado pelo Limulus Amebocyte Assay (LAL) quando esta era diluída 100.000. Dado os altos níveis de endotoxina da vacina DTP, não é surpresa que todas as crianças que receberam a vacina desenvolveram febre. Também, não seria

surpresa que um percentual menor de crianças apresentassem reações severas que incluíssem tremores, choque, colapso e eventual morte.

Não obstante os danos causados pelos altos níveis de endotoxina na vacina pertussis, estes foram tolerados, ou mesmo negligenciados, devido a dois fatores: 1. no período de 1940 e 1960, não existia um outro produto que propiciasse uma escolha; 2. porque os produtores desta vacina não tinham qualquer informação sobre o quantidade de endotoxina (Geier *et al.*, 1978).

A despeito destas dificuldades inerentes ao componente pertussis da vacina DTP, por volta de 1940, a maioria dos produtores utilizavam o método de Kendrick para a produção desta vacina.

O predecessor do FDA, “Division of Chemistry (1901) of the U.S. Department of Agriculture” e mais tarde “Bureau of Chemistry (1906)”, agindo com o mesmo rigor atual nos requerimentos para os teste de segurança e eficácia, aprovou a produção e o uso da vacina pertussis de células inteiras. Essa posição oficial sobre a vacina pertussis, somada ao baixo custo e a facilidade de produção, contribuiu para que todos os fabricantes, na época, investissem na produção desta vacina. Assim, mais e mais crianças começaram a receber vacinação voluntária contra a doença. Adicionalmente, os produtores iniciaram uma forte campanha junto as sociedades pediátricas e ao estado, incentivando a vacinação contra a coqueluche. Pelos meados de 1960, eles tinham conseguido o sucesso e a maioria dos estados tinham aplicado leis requerendo que todas as crianças em idade pré-escolar fossem imunizadas com a vacina DTP.

Com o amplo uso da vacina DTP vieram as primeiras publicações que se reportavam a danos irreversíveis causados no cérebro após a administração da vacina. Estas publicações geraram os primeiros informes ou cuidados de uso; entre eles que a vacina DTP não deveria ser administrada em indivíduos que apresentassem desordens neurológicas. Os clínicos também começaram a reportar sobre o pequeno número de crianças que morriam a cada ano vítimas das toxinas da vacina pertussis. O fato, é que em muitos anos, desde o início de 1950 até o presente, poucos artigos tinham sido publicados descrevendo efeitos adversos similares. Felton e Verwey, em 1953 informaram que “ virtualmente toda criança que foi imunizada com a vacina petussis apresentou alguma forma de toxicidade sistêmica dentro das 24 horas seguintes a injeção... se a criança sobreviver as seqüelas típicas, que seriam episódios descritos com severos generalizados, iriam remanescer seqüelas no sistema nervoso central”.

Justus Strom em 1960 advertiu: “Na Suécia como em outros países, complicações neurológicas severas foram observadas depois da vacinação com a vacina

pertussis. Uma investigação a nível nacional mostrou que 36 casos de complicações ocorreram em 215.000 vacinados (1 em 6000) durante o período de 1955 a 1958. A maioria destes casos consistia de convulsões, coma e colapso; havendo depois o restabelecimento da saúde; mas aconteceram quatro mortes, das quais duas foram súbitas e nove casos indicativos de encefalopatia com lesões severas com relação de 1 em 1.700” (Strom, 1960).

H.D.Piersma dos Laboratórios Wyeth®, que por muitos anos fabricaram a vacina DTP foi quem admitiu, durante o 4th International Symposium on Pertussis em 1963, sediado no NIH, “que havia um consenso geral entre os clínicos que o uso da vacina pertussis era ocasionalmente acompanhado de reações desfavoráveis e, que certamente essas reações eram severas e resultavam em danos permanentes ao sistema nervoso central” (NIH, 4th Symposium, 1963).

Mais tarde, Margaret Haire e colaboradores em 1967 concluíram “é sabido que a vacina DTP causou reações em muitas das crianças que foram vacinadas. Estas reações, que são amplamente atribuídas ao componente pertussis, variam de pirexia leve e mau humor, as quais são extremamente comuns, a sérios e às vezes fatal encefalopatia que felizmente é, excessivamente rara” (*apud* Haire, 1967). O descrédito em relação vacina DTP continuou durante o ano de 1970 (*apud* Kulemkampff, 1974). Mais tarde, em 1970, Bajc persistiu na observação que “desde que existe uma diferença significativa entre a incidência de ocorrências de qualquer evento espontâneos em crianças do mesmo grupo de idade e a incidência após a DTP, uma relação causal entre a DTP e os ataques apopléticos parecem estar confirmados.... os danos severos são particularmente trágicos, iatrogênicos e na maioria dos casos afetam principalmente as crianças completamente saudáveis” (*apud* Baje, 1965).

Um coro de críticas abateu-se sobre a vacina durante o ano de 1980. Em 1982, alguns médicos questionaram se a vacina não poderia ser a principal causa da síndrome da morte súbita e era importante saber se o risco de imunização poderia exceder em valor seus potenciais benefícios. Na Inglaterra, os pais foram incentivados a buscar compensação legal para danos provocados nas crianças pela vacina contra a coqueluche (Torc, 1982).

Em 1984, um pesquisador do FDA informou que as reações provocadas por um único lote poderiam variar de nenhuma reação a reação severa podendo incluir febre, choque, convulsões, choros persistentes e encefalopatia. Sintomas neurológicos poderiam acontecer precocemente ou poderiam demorar durante vários dias depois a injeção (Pitman, 1984).

Ainda em 1984, Barkin e colaboradores concordaram que a vacina DPT tem uma taxa alta de reações adversas, citando impressionantes taxas de incidência, chegando a 93% o percentual de pacientes que apresentaram reações adversas, inclusive febre, mudança de comportamento (irritabilidade) e reações locais. Encefalopatia e seqüela neurológica permanente ocorrem aproximadamente 1 em 310.000 imunizações. Outros pesquisadores concordaram que a toxina de pertussis causou deficiência orgânica celular no sistema nervoso central, trazendo como consequência variações que vão da irritabilidade ao coma (Berkin,1984).

Em 1985 o Instituto de Medicina Americano emitiu um relatório sobre eficácia e segurança de vacinas. Sobre a vacina contra a coqueluche, concluiu:

“Baixo grau de febre e inchaço local freqüentemente aparecem depois de injeção. Reações não esperadas e perturbações severas, incluindo, choque, convulsões, encefalopatias e choro persistente são complicações raras. ... a freqüência de reações fatais é estimada em um a dois casos por dez milhões de injeções e, a freqüência de desordens neurológicas sérias como encefalopatias em um caso por 110.000 injeções com deficiência orgânica e disfunção neurológica persistente depois de um ano” (MMWR, 1985).

Este relatório também foi enfático em declarar que o governo americano poderia economizar milhões de dólares se a vacina DTP clássica ou de células inteiras fosse substituída pela vacina DTP acelular como uma melhor forma de vacinação em crianças. Muitos outros pesquisadores concordaram com estas conclusões (Ibsen, 1985).

Em outro trabalho, posteriormente realizado com base no banco de dados do “Vaccine Adverse Events Reporting System” (VAERS) mantido desde 1990 pelo “Disease Control and Prevention” (CDC), Atlanta, Georgia sobre reações adversas provocadas pela vacinação com a vacina DTP, concluiu-se com a análise de dez milhões de doses aplicadas, que a vacina DTP apresentou índices estatisticamente significativos de reações como febre, convulsões, danos cerebrais e mortes além de baixas financeiras para o fundo da infância americano (MMWR,1991).

Por causa do efetivo programa de imunização com a vacina DTP, a coqueluche tinha se tornado um problema de doença infecciosa secundária nos Estados Unidos. Mas, o alto nível de toxicidade da vacina DTP tornou-se rapidamente visível e inaceitável para a população geral. Assim, a consciência da comunidade de científica alerta para os perigos associados com vacina pertussis conduziu-se a procurar técnicas e procedimentos diferentes para produzir um tipo de vacina menos prejudicial.

Apesar das aparências, em 1990, a vacina pertussis tinha sido completamente execrada pelo público e, mais tarde abandonada pelos médicos americanos. A crítica triunfou. Em 1985 o Instituto de Medicina norte-americano junto com a Academia de Ciências, depois de uma revisão extensa do problema de reações adversas para vacina de pertussis, deram a mais alta prioridade para trocar de vacina pertussis de células inteiras pela vacina pertussis acelular, de maneira a prevenir perdas monetárias e sofrimentos pessoais. O painel apresentado estimava que haviam sido utilizadas aproximadamente 18 milhões de doses da vacina DPT a cada ano. Esses injeções causaram 7,2 milhões de casos de reações menores ou secundárias, 10.300 ataques convulsivos, 164 casos de encefalites e 60 casos de inaptidão ou incapacidade crônica com custos na casa dos milhões. Também estimava-se que a vacina DTP causou entre 2 a 4 mortes por ano nos Estados Unidos da América. Este relatório foi ignorado e arquivado (MMWR,1990).

Ainda em 1990, outro relatório foi apresentado perante o Instituto de Medicina norte americano, sendo estes dados originários das pesquisas realizadas pelos próprios membros deste instituto que foram na época pegos de surpresa quando estes dados foram apresentados por Geier aos seus próprios colegas.

Este comitê concluiu então que as evidências apresentadas eram suficientes para considerar a vacina DTP como causadora da encefalopatia aguda. Mas não puderam concluir satisfatoriamente se vacina pertussis causava danos permanentes ao cérebro (MMWR,1990).

Em 1993, o Instituto de Medicina norte americano uma terceira vez se reuniu para considerar novos dados com relação a segurança da vacina DTP. Nesta época concluíram que os dados apresentados demonstravam que a vacina DTP causava danos permanentes ao cérebro (MMWR,1993). Com isso seguiu-se uma publicação em 1994, deste instituto, seguido de idêntica publicação feita pelo Departamento de Saúde e Serviços Humanos americano concluindo suas posições oficiais no Federal Register, idênticas as dos comitês mencionados (Fed. Reg, 1994). A Academia Americana de Pediatria também notificou esta mesma posição aos seus membros (Larson, 1994).

Estas mudanças de posição em relação a vacina pertussis começaram a acontecer por um número considerável de razões. Primeiro, porque em 1993 o grupo britânico do NCEC depois de dez anos publicou um estudo original que foi persistente na discussão de que vacina DTP causava dano neurológico que se apresentava como permanente (Miller, 1993). Segundo, porque um grupo de juizes que trabalham para o VCA, tinham premiado com grandes quantias de dinheiro solicitantes a quem estes

juízes acreditavam tinham provado o surgimento de dano neurológico permanente depois da vacinação com a vacina DTP. Terceiro, pressão de litigação civil começando novamente a ser uma ameaça aos fabricantes de vacinas. Quarto, e mais importante, os fabricantes de vacina que produziam a vacina DTP clássica se deram conta de que várias companhias estavam engendrando esforços para conseguirem licença para produção da vacina DTP acelular nos Estados Unidos. Eles teriam que fazer a vacina acelular para protegerem sua posição no mercado interno.

Com os resultados das publicações de 1993 e 1994, puderam ser melhor analisadas as frequências de encefalopatias associadas com a vacina DTP. Demonstrou-se, com um razoável grau de certeza médica, mais provável do que não que a vacinação com a DTP era responsável por causar reações de encefalopatia por até sete dias depois de imunização em crianças normais (MMWR,1991). Especificamente, os resultados destas pesquisas mostraram um percentual maior do que 77% de associação da vacina DTP e encefalopatias quando comparados com os dados dos valores do fundo da infância dos EUA utilizados em casos de encefalopatias ocorridos por até sete dias depois de imunização com a vacina DTP.

#### *1.5.4 Eventos Adversos que ocorrem após o uso das vacinas que contêm os componentes Diftérico, Tetânico e Pertussis*

As vacinas não estão isentas de provocar problemas clínicos e, inclusive podem provocar a morte do indivíduo (Bellanti *et al*, 1987).

Até bem pouco tempo, os compêndios que tratavam do estudo das vacinas não direcionam uma atenção especial ao entendimento dos mecanismos biológicos ou farmacológicos envolvidos nas reações adversas. Estes fatos na maioria das vezes não eram motivos de publicação ou revisão. Maior ênfase sempre era dada às reações que são provocadas pela resposta imunológica. Esta resposta geralmente pode na maioria das vezes conduzir a um tipo de reação chamada de reação de hipersensibilidade. Coombs e Gell foram os descobridores de quatro tipos de danos decorrentes desta resposta: I. anafilático, II. citotóxico, III. por complexos antígenos-anticorpos e IV. hipersensibilidade celular sendo, a maioria dos eventos descritos a seguir, pelo menos teoricamente, inseridos dentro desta classificação (Gutiérrez, 1992).

Segundo o Manual de Vigilância Epidemiológica dos Eventos Adversos Pós-Vacinação – Ministério da Saúde - Brasil, geralmente dois tipos de reações podem

ocorrer no homem após a administração de vacinas que contenham os componentes diftérico, tetânico e pertussis: reações locais e reações sistêmicas.

As reações locais, que são relativamente comuns e possuem graus variados de severidade, são descritas como: inchaço, endurecimento, edema, dor, eritema e algumas vezes abscessos com ulcerações no local da injeção. São reações que podem ocorrer a poucas horas da aplicação do produto, podendo a reação persistir por várias horas ou dias.

Determinadas reações sistêmicas são menos comuns.

A febre maior do que 38 °C é geralmente uma manifestação sistêmica, como a sonolência, irritação e anorexia. Mais raramente, podem ocorrer colapso (relacionado ao episódio hipotônico hiporesponsivo), paralisias, convulsões e morte (M.S., 1988), Quadro 9.

Este manual faz as considerações, resumidamente descritas a seguir, sobre os eventos adversos produzidos pela vacina DTP, pela vacina dupla de uso adulto e infantil e pelo toxóide tetânico.

**Quadro 5**

**Eventos adversos no período de 48 horas  
após aplicação da vacina tríplice DTP  
(Cody e cols., 1981)**

<b>Eventos adversos locais</b>	<b>Frequência(*)</b>
Vermelhidão	1/3 doses
Edema	2/5 doses
Dor	1/2 doses
<b>Eventos adversos sistêmicos</b>	
<b>Frequência(*)</b>	
Febre	1/2 doses
Sonolência	1/3 doses
Irritabilidade	1/2 doses
Vômito	1/15 doses
Anorexia	1/5 doses
Choro persistente, inconsolável (com duração igual ou maior que três horas)	1/100 doses
Febre (temperatura igual ou maior que 40,5°C)	1/330 doses
Colapso (episódio hipotônico-hiporesponsivo)	1/1.750 doses
Convulsão (associada ou não com febre)	1/1.750 doses

(\*) Em relação à quantidade total de doses, independentemente do número da dose na série.

Para a vacina DTP as manifestações locais são freqüentes e podem comprometer transitoriamente a movimentação do membro e diz-se que resultam provavelmente da ação irritativa dos componentes da vacina, em especial do adjuvante contendo hidróxido de alumínio. Nódulos indolores são de aparecimento ocasionais e são reabsorvidos ao fim de várias semanas. Em alguns casos há a formação de abscessos no local da injeção,

que podem ser estéril ou séptico. Há uma tendência do aumento da frequência destas manifestações locais com a aplicação de doses subseqüentes, mas estes eventos, tem uma boa evolução para a cura espontânea na maioria dos casos.

A febre se manifesta, na maioria dos casos nas primeiras 24 horas (normalmente entre 3 e 6 horas) depois da administração da vacina. Em alguns casos a febre pode ser alta e persistir por mais de 24 horas. Sua manifestação é aumentada com a administração de maior número de doses.

A sonolência prolongada, anorexia pouco intensa e transitória, vômito relatado com frequência após a primeira dose da vacina, choro persistente, de forma contínua e incontrolável constituem-se também eventos observados após a aplicação da vacina DTP.

O episódio hipotônico-hiporesponsivo (EHH) se caracteriza por instalação súbita, com o quadro clínico constituído por palidez, diminuição ou desaparecimento do tônus muscular e diminuição ou ausência de resposta a estímulos, manifestando-se nas primeiras 48 horas, normalmente nas primeiras seis horas à aplicação da vacina. Na maioria das crianças inicialmente ocorre irritabilidade e febre. Podendo durar alguns minutos ou até um dia ou mais. Podem aparecer: cianose, depressão respiratória, sono prolongado com despertar difícil e inclusive, perda da consciência. Admite-se que alguns casos descritos como EHH possam confundir-se com reação do tipo anafilático.

A presença de urticária ou angioedema, particularmente da laringe, indica a ocorrência de reação alérgica. Há situações em que a convulsão seguida por perda súbita do tônus muscular e da consciência pode simular o EHH.

O quadro convulsivo pode se instalar até 72 horas da e geralmente é acompanhado de febre, estando ausentes sinais neurológicos focais. Aparece tanto no esquema inicial quanto após a administração da dose de reforço.

A encefalopatia, no caso da vacina DTP, é um termo utilizado quando a doença se assemelha clinicamente à encefalite, mas sem evidência de reação inflamatória. Segundo a padronização das definições propostas pela WHO, considera-se que a encefalopatia aguda é associada cronologicamente com a DTP, quando ocorrer até sete dias da aplicação da vacina, caracterizando-se por: a) convulsão; b) alteração profunda do nível da consciência, com duração de um dia ou mais; c) nítida alteração do comportamento, que persiste por um dia ou mais. É um quadro raro, varia de 0,0 a 10,5 casos a cada um milhão de doses aplicadas.

As reações de hipersensibilidade podem ser do tipo anafilático ou não. A anafilaxia é imediata (reação de hipersensibilidade do tipo I de Gell & Coombs) e

ocorre mais freqüentemente nos primeiros trinta minutos da exposição ao alérgeno, apresentando uma ou mais das seguintes manifestações: urticária, sibilos, laringoespasmos, edema dos lábios, hipotensão e choque.

O choque anafilático provocado pela vacina DTP, ocorre raramente podendo instalar-se logo após a vacinação e caracteriza-se por insuficiência circulatória (hipotensão arterial, pulsos periféricos finos ou ausentes, extremidades frias, face congesta, respiração aumentada e alteração do nível da consciência, acompanhada ou não de manifestações cutâneas (urticária, edema facial ou edema generalizado) e ou de broncoespasmo e ou de laringoespasma.

Ainda não se conseguiu identificar relação causal entre a anafilaxia e um dos componentes da vacina DTP, de tal modo que a ocorrência da anafilaxia após a administração desta vacina contra indica a aplicação de doses subseqüentes que contenham qualquer um dos elementos da vacina.

As alterações cutâneas (urticária, exantema macular, papular, maculopapular ou aparecimento de petéquias) que podem surgir horas ou dias após a aplicação da vacina são frequentemente resultantes de reação antígeno-anticorpo, sem significado patológico importante, ou são devidas a outras causas (viroses, por exemplo), sendo pouco provável que reapareçam após a aplicação de dose subseqüente da vacina.

Todos estes eventos são normalmente atribuídos ao componente pertussis da vacina DTP. Ao toxóide tetânico e a vacina dupla (difteria e tétano), quando utilizados de acordo com suas recomendações, habitualmente, poucos efeitos reatogênicos são atribuídos.

Acredita-se que a incidência e a gravidade das manifestações locais estejam relacionadas ao número anterior de doses aplicadas, podendo também ter causa na concentração dos antígenos, na presença e quantidade do adjuvante, na via e método de administração. A presença de outro antígeno também tem participação no processo. Os estudos mostram que o número de doses, aumentam a incidência da reação local: dor (50 a 85% dos receptores), edema e eritema (25 a 30% dos receptores).

O hidróxido de alumínio, teoricamente, é colocado como indutor de alterações inflamatórias locais, devido a ativação do sistema complemento e estimulação de macrófagos.

Quanto a via e a forma de administração, observou-se que as reações locais podem aumentar com a administração subcutânea dos toxóides, em relação a via intramuscular, havendo o aparecimento de abscessos estéreis no local da aplicação. Já os injetores a pressão, que provocam depósito no tecido celular subcutâneo, tem causado

incidência duas vezes maior de edema no local da injeção em relação a administração da vacina com a agulha.

Os resultados de estudos controlados comparando o toxóide tetânico associado ao diftérico (DT) com o toxóide tetânico puro (TT), indicam que efeitos adversos mínimos, tais como febre, edema e dor ocorrem mais freqüentes nos receptores de DT que nos receptores de TT.

Alguns estudos tem denotado que o nível de anticorpos circulantes para o tétano tem relação direta com a intensidade das reações locais. Achados similares são encontrados quando se comparam pessoas que apresentam resposta imunológica rápida com aquelas que não apresentam. Admite-se portanto que os anticorpos pré-formados, formam complexos com os toxóides depositados, que induzem intensa resposta inflamatória (reação ou fenômeno de Arthus ou reação de hipersensibilidade do tipo III).

Essas reações quando muito acentuadas, geralmente são seguidas de febre, que também ocorre quando os níveis de antitoxina no sangue estão elevados. Dor de cabeça ou mal-estar geral podem ocorrer, embora com pequena freqüência. Ao receber doses de reforço, os indivíduos com altas concentrações séricas de antitoxina, raramente apresentam febre alta e mal-estar geral, sem a ocorrência simultânea de reações locais intensas.

Reações de hipersensibilidade (hipersensibilidade tipo III), linfadenomegalia e reações neurológicas (neuropatia periférica), são raríssimas como uso desses toxóides, mas há contra-indicação da dose reforço até dez anos depois da aplicação da última dose, se houver história de reação local grave, consistente com reação do tipo Arthus.

Ainda, segundo o mesmo Manual de vigilância epidemiológica dos eventos adversos após vacinação:

“ ...É, portanto, indispensável criteriosa avaliação clínica e laboratorial desses casos, para busca rigorosa do diagnóstico etiológico, com a finalidade de que o evento adverso, a seqüela ou mesmo o óbito não sejam atribuídos à vacina, sem fundamentação científica. É preciso ainda ficar alerta para o fato de que o evento adverso pós vacinal freqüentemente é uma doença intercorrente, que precisa ser diagnosticada e tratada adequadamente...”(M.S.,1988).

## ***1.6 Relevância do Trabalho***

De qualquer maneira, não podemos nos esquecer que mesmo estando colocada como uma das mais comuns infecções que acometem o ser humano, as interações parasita-hospedeiro na coqueluche, ainda não estão totalmente compreendidas e esta doença ainda se apresenta como de grande importância em saúde pública sendo a vacina DTP uma demanda social para vários países do mundo, inclusive para Brasil e, de acordo com a OMS é um tipo de medicamento que representa um esforço em proteger as crianças o mais cedo possível contra doenças características da primeira infância.

Outro fato que trás um significado relevante na utilização desta vacina é que o grupo alvo de sua aplicação são crianças saudáveis, o que faz com que os aspectos relacionados a sua segurança assumam também um caráter importante já que apesar de ser utilizada há muitos anos, referências sobre desordens neurológicas, choques e convulsões têm sido associadas a sua utilização.

Neste aspecto, novamente temos que enfatizar, que os mecanismos fisiopatológicos destas reações ainda são desconhecidos e que o pouco conhecimento sobre as causas da toxicidade desta vacina tem levado por um lado, aos produtores buscarem alternativas vacinais eficientes e menos tóxicas, e por outro, às autoridades nacionais de controle da qualidade juntamente com a OMS têm empenhado um esforço crescente de forma a desenvolver ensaios que possam contribuir para um controle mais abrangente da vacina existente (Manclark, 1978).

Apesar de todo este esforço, o teste de ganho de peso (ou toxicidade específica) é o único que se veste de uma forma mandatória para o controle da toxicidade específica para vacinas celulares como se pode observar nas Recomendações da OMS, nos Regulamentos do CFR/FDA, nas Farmacopéias Européia e Brasileira e nos Requerimentos Mínimos para Biológicos do Japão.

A manutenção deste ensaio nestes requerimentos está relacionada não somente à verificação da toxicidade intrínseca da *B. pertussis* mas também ao controle do processo produtivo, pois existe um delicado balanço entre a detoxificação e a potência da vacina, que são influenciados pela interrelação de vários fatores como a cepa bacteriana, o meio de cultivo, os métodos de detoxificação, o uso de preservativos e adjuvantes e fatores inerentes a cada laboratório produtor.

Numa busca por soluções para estes problemas, a OMS tem indicado ensaios complementares que possibilitem a obtenção de maiores informações sobre o produto

em questão, sobre sua formulação e sobre o desenvolvimento de procedimentos efetivos de controle de qualidade.

Estas recomendações refletem uma preocupação com a segurança (toxicidade e reatogenicidade), efetividade (potência), estabilidade e consistência das vacinas que serão produzidas.

Desta maneira entendemos que nossa proposta vem ao encontro dessa busca de soluções, pois o que pretendemos é compreender como irão se comportar determinados modelos de ensaios biológicos nas respostas induzidas pelos componentes da vacina DTP. Sabemos que estas respostas se traduzem em primeiro plano nas reações adversas locais e em segundo plano em um efeito sistêmico sendo que os dois se iniciam a partir de reação inflamatória produzida pela vacina DTP.

Assim, para a execução deste propósito, procuramos por modelos de ensaios laboratoriais, que têm como substrato a utilização de camundongos para a análise destas diferentes respostas biológicas, que correspondem a indução do edema de pata e da análise da população celular de leucócitos.

Paralelamente, procuramos investigar o efeito “clustering” em células CHO, a presença de endotoxina pelo LAL e a expressão de citocinas pró-inflamatórias pelo método de ELISA e a investigação histopatológica.

## ***II. OBJETIVOS***

### ***II.1 Objetivo Geral***

Investigar a resposta inflamatória produzida em camundongos por duas vacinas DTP de diferentes produtores em um estudo comparativo com as vacinas DT, DTPa e uma vacina de Referência.

### ***II.2 Objetivos específicos***

1. Avaliar o conteúdo de Toxina Pertussis ativa presente nas vacinas utilizadas através do método do efeito clustering em células CHO.
2. Avaliar o conteúdo de LPS através do método do LAL nas vacinas utilizadas.
3. Avaliar o curso temporal da reação local produzida, através da medida do edema de pata.
4. Avaliar alterações histopatológicas decorrentes do tratamento com as diferentes vacinas.
5. Verificar a dinâmica das populações celulares de leucócitos.
6. Avaliar os níveis sanguíneos de IL-1 (Interleucina tipo 1 beta), IL-6 (Interleucina tipo 6) e TNF- (Fator de Necrose Tumoral alfa) nos camundongos inoculados.

### **III. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **III.1 Animais**

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57/BL6, machos, com peso entre 20 e 25g, e com idade em torno de 16 semanas no momento do ensaio, provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da FIOCRUZ.

Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico, acomodados em grupos de seis animais por caixa, fechadas com tampa de aço inox e forradas com piso constituído de maravalha de pinho branco.

Alimentação e água foram fornecidos *ad libitum* por todo o tempo do experimento: água filtrada da rede pública de abastecimento e ração para camundongos da marca NuvLab, tipo CR 1.

A limpeza e troca das caixas e camas de maravalha foram feitas três vezes por semana (segundas, quartas e sextas) no período da manhã.

A temperatura de manutenção dos animais foi de  $22 \pm 2$  °C e umidade relativa do ar em torno de 55%, com ciclo constante de períodos claro e escuro (período claro de 07 às 19 horas).

Os animais, antes do ensaio, foram pesados, identificados individualmente e separados em caixas contendo 5 ou 6 animais cada.

O projeto intitulado “Verificação da toxicidade específica do componente pertussis na vacina DTP” apresentado para esta tese de mestrado, foi submetido a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ e foi considerado aprovado por esta comissão sob o número P0149/02.

#### **III.2 Produtos Testados**

##### III.2.1 Duas Vacinas DTP: DTP 1 e DTP 2 (de produtores diferentes)

###### Quadro 6

###### **DTP-1 COMPOSIÇÃO POR 0,5 mL (Segundo a bula)**

**Toxóide Diftérico - suficiente para a indução de 02UI de antitoxina em cobaia**  
**Toxóide Tetânico - suficiente para a indução de 02UI de antitoxina em cobaia**  
**Vacina Pertussis (coqueluche) - equivalente a 04 UI de dose individual humana**  
**Excipientes: hidróxido de alumínio, timerosal, e solução fisiológica tamponada (pH 6,4)**

### Quadro 7

#### DTP-2 COMPOSIÇÃO POR 0,5mL (Segundo o rótulo)

**Toxóide Diftérico - 25 Lf ( 30 UI)**  
**Toxóide Tetânico - 5 Lf ( 40UI)**  
**B. pertussis - 16 UO ( 4 UP)**  
**Adsorvida sobre Fosfato de Alumínio - 1,5mg**  
**Agente de Conservação - Timerosal 0,01%**

### III.2.2 Vacina DTP Acelular

### Quadro 8

#### DTP acelular Composição Completa em 0,5 mL da vacina (Segundo bula)

**Toxóide Pertussis (TP) - 10 g**  
**Hemaglutinina Filamentosa (HAF) - 5 g**  
**Fímbrias (Agg 2 e 3) - 5 g**  
**Pertactina (69kDa) - 3 g**  
**Toxóide Diftérico - min. 30UI**  
**Toxóide Tetânico - min. 40UI**  
**Fosfato de Alumínio - 1,5mg**  
**(alumínio) - 90,33mg)**  
**2-fenoxietanol (conservante) - 0,6% ± 0,1%**  
**Água para injeção - q.s.p. 0,5mL**

### III.2.3 Vacina Dupla Infantil

### Quadro 9

#### Vacina DT COMPOSIÇÃO (Segundo documentação anexa)

**Toxóide Diftérico - contendo 25Lf**  
**Toxóide Tetânico - contendo 5 Lf**  
**Adsorvida sobre Hidróxido de Alumínio - 1,5mg**

### III.2.4 Vacina de Referência

### Quadro 10

#### Vacina de Referência Lot 11/FDA- Composição

**Liófilo de B. pertussis contendo 10 UI/mL quando ressuspenso em 3,32mL de solução salina**

Esta vacina foi diluída de forma a conter 32 Unidades Opacimétricas.

Em todos os casos foi utilizada uma dose correspondente a 50µl dos produtos a serem testados por via de inoculação subcutânea na região plantar da pata esquerda.

É importante destacarmos que na vacina DTP Clássica (ou de Células Inteiras) também encontramos os componentes descritos no Quadro 11.

#### Quadro 11

##### Conteúdo dos Antígenos encontrados na vacina DTP Clássica

**LPS - 0,9 a 2,8 g por mL (com decaimento de 60% a 80% depois de 5 a 6 meses\*)**

**FHA - 0 a 1,6 g por dose \*\***

**PT - 0,02 a 0,68 g por dose \*\***

**Toxóide Tetânico - 40 g por dose (10Lf)**

**Toxóide Diftérico - 80 g por dose (20Lf)**

**\*Ibsen et al. 1988**

**\*\*Ashwort et al. 1983; Bernier 1982**

### ***III.3 Ensaio in vitro de clustering em células CHO***

O ensaio *in vitro* denominado efeito clustering em células CHO (células de ovário de hamster chinês) é um ensaio que tem por finalidade a detecção do conteúdo da toxina pertussis ativa em vacinas DTP. Este ensaio está baseado na mudança morfológica, denominada “clustering” (do inglês: cacho), que ocorre quando estas células estão na presença da toxina pertussis ativa.

Para execução deste ensaio foi utilizado o protocolo estabelecido pelo National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) da Inglaterra (NIBSC, 1999a).

Inicialmente as amostras DT, DTP 1, DTP 2 e DTP acelular foram diluídas na proporção de 1/10 em PBS sendo a Vacina de Referência diluída na proporção 1/50.

Uma microplaca de 96 orifícios foi preenchida com 20 µL de meio de cultura MEM (Minimum Essential Medium) suplementado com soro fetal bovino (10% p/v), sulfato de estreptomicina (100 µg/mL), Penicilina G potássica (100 UI/mL) e L-glutamina (2 mM), em cada um de seus 88 poços (colunas 2 a 12), meio MEM completo.

As amostras, juntamente com uma Toxina Pertussis de Referência (NIBSC 90/518) contendo 128 ng/mL, foram adicionadas em duplicata às colunas 1 e 2 da microplaca. A partir da coluna 2 as amostras foram diluídas na proporção 1/2

utilizando-se de uma micropipeta de 8 canais ajustada ao volume de 20  $\mu$ L, totalizando 11 diluições.

A última coluna de cada microplaca foi empregada como controle negativo contendo somente o meio MEM.

Após as diluições,  $5 \times 10^3$  células CHO em 180  $\mu$ L de meio MEM foram adicionadas a cada um dos 96 orifícios seguida de incubação durante 48 h a 37 °C em estufa com atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Quarenta e oito horas depois, as culturas foram coradas com solução etanólica de cristal violeta 0,75 % p/v em formaldeído e examinadas ao microscópio invertido para a observação da ocorrência do efeito clustering (ou formação de cachos).

O processo de coloração das células, após a remoção do meio de cultura, inicia-se com a fixação das células com formaldeído a 10% durante 15 min. Após essa etapa, remove-se o formaldeído, lavando-se as placas durante cerca de 5 min em água corrente. O excesso de água é removido e adicionada a solução de cristal violeta por 15 min. Em seguida, as placas são enxaguadas várias vezes em água corrente e depois são colocadas para secar à temperatura ambiente por cerca de 18 h.

O resultado do ensaio é expresso de acordo com a maior diluição da amostra na qual se observa o agrupamento total de células em forma de cachos.

O título de referência (em ng/mL) é calculado multiplicando-se a concentração de partida da Toxina Pertussis (128 ng/mL) pelo fator de diluição da maior diluição na qual se observa total aglomeração de células.

O conteúdo de Toxina Pertussis ativa das amostras é calculado multiplicando-se o recíproco do fator da maior diluição das amostras no qual se observa total aglomeração das células, pelo título de referência (ng/ml) e pelo fator de diluição inicial das vacinas, isto é, por 10 para as vacinas DT, DTP-1, DTP-2 e DTPa e, por 50 para a Vacina de Referência.

O ensaio é considerado válido quando não se observa o efeito clustering nas células que fazem parte do controle negativo.

Para este ensaio, de acordo com o protocolo utilizado (NIBSC), as vacinas DTP celulares são consideradas satisfatórias quando apresentam conteúdo de Toxina Pertussis ativa menor que 1000 ng por dose humana (uma dose humana da vacina correspondente a 0,5 mL).

Para a execução deste ensaio utilizamos o Procedimento do Setor de Ensaio Toxicológicos do Laboratório de Toxicologia do Departamento de Farmacologia e

Toxicologia do INCQS/FIOCRUZ/MS. Setor responsável pela coordenação deste ensaio.

#### **III.4 Quantificação da Endotoxina pelo método do LAL**

O método do *Limulus Amoebocyte Lisate* (LAL) por gelificação ou gel-clot foi o método utilizado para a quantificação de endotoxina nos produtos testados. O lisado de amebócito utilizado neste ensaio é proveniente *Limulus polyphemus* (caranguejo-ferradura).

A endotoxina é uma substância produzida por bactérias Gram negativas como um componente encontrado na membrana celular destas bactérias. É identificada como um pirógeno, ou seja substância que induz um aumento de temperatura (febre) quando inoculada por via parenteral ou quando presente em infecções.

Para a execução deste ensaio utilizamos o Procedimento Operacional Padrão do setor de Pirogênio do Departamento de Farmacologia e Toxicologia do INCQS/FIOCRUZ/MS (INCQS, POP65-3330-006, 2005), setor responsável pela coordenação deste ensaio.

Os produtos a serem testados foram diluídos em água apirogênica nas seguintes proporções: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:20000, 1:40000, 1:80000, 1:160000, 1:320000, 1:640000, 1:1280000 em tubos de boro silicato despirogeneizados. De cada uma destas diluições foram retirados 100  $\mu$ L e adicionados a tubos contendo 100  $\mu$ L de LAL, que foi previamente diluído. Esta mistura foi solubilizada por 60 segundos e incubada a 37 °C em banho maria sem agitação por uma hora. Para leitura do teste os tubos foram retirados do banho maria e submetidos a uma inversão de 180°. O teste é considerado positivo quando se forma um coágulo branco que se fixa no fundo do tubo, não se deslocando com a inversão e, negativo quando é denotada a ausência de formação de coágulo no fundo do tubo, constatado após a inversão de 180° do tubo.

A validade do ensaio é constatada pela utilização de dois grupos controles (normalmente em duplicata), um positivo e outro negativo. O controle positivo é formado por tubos contendo LPS de *E. coli* e água apirogênica e o controle negativo apenas por água apirogênica. Após a adição do LAL, os controles são como as amostras solubilizados por 60 segundos e mantidos em banho maria por 37 °C por uma hora.

A concentração de endotoxina é calculada, multiplicando-se o valor de sensibilidade do LAL ( $\lambda = 0,125$ ) pelo fator de diluição da maior diluição em que foi observada a formação do coágulo.

### **III.5 Medida do Edema**

O objetivo desta medida, foi verificar a resposta inflamatória, caracterizada pela formação do edema, em função do tempo. Para análise deste tipo de reação utilizamos uma técnica muito empregada em farmacologia para medir reações locais e de hipersensibilidade, *i.e.* a quantificação de edema ou edema de pata, usada para avaliar a capacidade de uma droga em produzir ou reduzir um processo inflamatório (Manclark *et al.*, 1976). Entendemos que trata-se de uma metodologia apropriada já que vários trabalhos têm se reportado a um aumento da sensibilidade em camundongos para a formação de edema local quando da aplicação da vacina DTP, mesmo a DTP acelular em boosters vacinais (Yamamoto *et al.*, 2002).

Normalmente esta resposta identifica 3 fases: fase aguda, fase intermediária e fase crônica. Assim, o edema foi medido após intervalos de tempo que coincidiram com o início do edema, a fase máxima do edema e com a fase de regressão do edema. Estas fases coincidiram com os períodos de tempo de 2 (duas), 6 (seis), 12 (doze), 24 (vinte e quatro), 48 (quarenta e oito), 72 (setenta e duas) e 96 (noventa e seis) horas posteriores a aplicação da vacina.

Para medida do edema utilizou-se de um pletismômetro (ou pletismógrafo). Com este aparelho é possível registrar alterações no tamanho da pata dos camundongos, expressas como medida de volume que é medido através do deslocamento de uma coluna de água contendo cloreto de sódio e tensoativos no momento em que a pata do animal é introduzida nesta coluna de água. O registro do volume deslocado é feito pela medida da diferença de potencial elétrico. O aparelho tem a possibilidade de ser ajustado para a grandeza do volume que se quer medir. No trabalho em questão ele foi ajustado para medir variações da ordem de 50  $\mu$ L.

O edema foi induzido após a administração de 50  $\mu$ L de cada vacina por via subcutânea na pata esquerda de dezoito camundongos C57/BL6 machos. Como controle negativo ou controle do edema utilizamos a pata direita que não foi inoculada.

Ensaio prévios nos indicaram que para vacinas que apresentam em sua formulação os componentes antigênicos Diftérico, Tetânico e o componente Pertussis, os melhores intervalos nos quais o edema deveria ser medido seriam de 2h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h e 96h.

### ***III.6 Análise Histopatológica***

Após cada leitura do edema, um animal de cada grupo experimental foi sacrificado em câmara de CO para que a pata edemaciada fosse submetida a exame anatomo-histopatológico. O procedimento para esta análise compreendeu as seguintes etapas:

- (i) fixação das patas posteriores em formol tamponado a 10%;
- (ii) descalcificação, com o uso de solução contendo EDTA;
- (iii) processamento do material para cortes histológicos de 5 micra em parafina;
- (iv) coloração pela Hematoxilina & Eosina;
- (v) análise em microscopia de luz para avaliação da reação inflamatória local e
- (vi) obtenção de slides fotográficos.

Os procedimentos para esta análise foram realizados e coordenados pelo Setor de Anatomia e Histopatologia do Departamento de Farmacologia e Toxicologia do INCQS/FIOCRUZ/MS.

As etapas descritas tem como referência o Procedimento Operacional Padrão 65-3320-001 (INCQS, POP 65-3320-001, 2001).

### ***III.7 Contagem Total e Diferencial das Células Sangüíneas***

Utilizou-se câmara de Neubauer com retículo formado por nove quadrados de 1 mm de área, tendo portanto, 9mm de superfície. A profundidade da câmara é de 0,1 mm. Logo, o volume total da câmara será de 0,9 mm . Cada um destes 9 quadrados é subdividido em 16 pequenos quadrados, medindo cada um 1/16 do mm . O quadrado central é dividido em 25 pequenos quadrados, medindo cada um 1/25 do mm . Cada um desses é dividido em outros 16 quadradinhos, medindo 1/400 do mm .

A fórmula geral para contagem das células é:

$$\text{células/mm} = \text{células por mm} \times \text{profundidade da câmara} \times \text{diluição}$$

Para a contagem dos glóbulos brancos utilizamos todos os quatro quadrados externos. A leitura é feita com microscopia ótica (aumento de 10x) após diluição das células (40x) em líquido de Türk.

A coleta do sangue foi realizada através de pequena incisão feita na cauda de 5 ou 6 camundongos, antes do início do ensaio e ao final do ensaio (96 horas), coletando-se o sangue com micropipeta de 10 L.

Os esfregaços para contagem específica das células, foram feitos em lâminas para microscopia de luz e corados pelo método de coloração Giemsa.

### ***III.8 Dosagens das Citocinas***

Paralelamente a investigação que diz respeito aos mecanismos celulares envolvidos na resposta inflamatória aguda, procedemos a análise de determinadas moléculas também envolvidas na resposta inflamatória aguda, as citocinas IL-1, IL-6 e o TNF- $\alpha$ .

Para as dosagens de TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-6 foi utilizada a técnica de ELISA, empregando-se anticorpos monoclonais específicos de acordo com as instruções do fabricante. O protocolo utilizado foi da R&D: Duo Set Kit.

Para esta análise utilizou-se do centrifugado do plasma do sangue dos camundongos, coletado nos mesmos períodos nos quais o edema foi medido: 2h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h e 96h. O sangue para estas dosagens foi coletado por punção cardíaca, imediatamente após a morte do animal em câmara de CO<sub>2</sub> sendo adicionado de citrato de sódio, mantido em banho de gelo e centrifugado.

Para tal procedimento, um grupo de 5 (cinco) animais foi mantido durante o período do ensaio para ser submetido a coleta do sangue em cada tempo indicado acima.

As dosagens das citocinas foram feitas a partir de uma alíquota do sangue obtida por sangria “branca” (total) de camundongos sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>. Ao sangue obtido foi adicionado ácido cítrico 3,2% para evitar coagulação, sendo o mesmo mantido em banho de gelo. Logo após o sangue foi centrifugado para obtenção do plasma. O plasma obtido foi estocado a 70 graus negativos para posteriormente ser utilizados nas dosagens.

Basicamente os protocolos para estas dosagens podem ser descritos da seguinte maneira: placas Nunc de 96 poços foram revestidas com anticorpos de captura (anticorpos monoclonais purificados), cobertas e incubadas em torno de 16h em geladeira. No dia seguinte, após três lavagens com PBS/Tween as placas foram bloqueadas com PBS/BSA 1% para evitar ligações inespecíficas. Após uma hora foram submetidas a quatro lavagens com PBS/Tween sendo então adicionados a citocina padrão e as amostras (plasma). Novamente foram incubadas em 16h em geladeira. Foram então adicionados os anticorpos de detecção conjugados com biotina (anticorpos monoclonais biotinilado), deixando a reação por mais uma hora. Foram feitas novas lavagens e o substrato (avidina-peroxidase) foi colocado para incubação por cerca de 30

minutos. Em seguida o revelador OPD foi adicionado. A leitura foi feita em leitora de placa a 450 nm. Os dados foram analisados através do programa Soft Max Pro, com as dosagens baseadas nos valores obtidos através dos respectivos padrões de citocinas utilizados.

### ***III.9 Análise Estatística***

O tratamento estatístico dos dados foi realizado através da análise de variância de uma via (ANOVA) ou pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, quando os dados não se ajustavam a uma curva normal.

A existência de diferença significativa entre dois grupos foi estabelecida pelo teste de t de Student ou, no caso da análise não-paramétrica, pelo teste de U de Mann Whitney. Em todos os casos as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ . Os cálculos estatísticos foram realizados por meio do “software” Minitab 10.5 (Minitab Statistical Software™, Minitab Inc., PA, USA, 1995).

### III.10 Preparo das Soluções

#### Citrato de Sódio (3,2%):

Citrato de Sódio	3,2g
H <sub>2</sub> O	100 mL

#### Giemsa:

Giemsa	1g
Glicerina	60 mL
Metanol	56 mL

Diluir a solução de Giemsa 10x em água destilada no dia da coloração da lâmina:

#### Líquido de Türk:

Ácido ac[etico glacial P.A.	20,0 g
Cristal violeta	50,0 mg
H <sub>2</sub> O	1 L

#### OPD

Dihidroclorido )-fenilenediamina	1 cápsula
Tampão do OPD	50 mL

#### PBS 10x

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	12,5 g
Na Cl	71 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
KCl	2 g
H <sub>2</sub> O	1 L

#### PBS Tween 20

PBS 1x	100 mL
BSA 1%	1 g

#### Tampão do OPD

Tampão Fosfato-Citrato	1 cápsula
H <sub>2</sub> O mQ	100 mL

#### Salina 0,9%

NaCl	0,9 g
H <sub>2</sub> O	100 mL

### ***III.11 Reagentes***

Ácido Acético: Merck

Anticorpo biotilado de cabra anti IL-1 de camundongo: Duo Set Kit - R&D

Anticorpo biotilado de cabra anti IL-6 de camundongo: Duo Set Kit - R&D

Anticorpo biotilado de cabra anti TNF- de camundongo: Duo Set Kit R&D

Avidina - Peroxidase: Sigma

BSA: Sigma

Giemsa: Sigma

KCL: Merck

KH PO : Sigma

Metanol: Merck

Na HPO (7H O): Riolab

NaCL: Sigma

NaHCO : Sigma

OPD: Sigma

Tampão do OPD: Sigma

Tween 20: Sigma

#### **IV. RESULTADOS**

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos na avaliação de cada um dos produtos estudados.

##### **IV.1 Resultados referentes a vacina DTP-1**

###### **IV.1.1 Ensaio clustering em células CHO**

Uma vez que estamos estudando a reação local produzida pela vacina DTP e compreendendo que esta é uma reação inflamatória aguda que tem como um dos principais agentes causais um dos componentes tóxicos da vacina denominado Toxina Pertussis, lançamos mão de um ensaio específico para dosagem desta toxina: a verificação do efeito clustering em células CHO.

Procuramos assim, investigar o conteúdo desta toxina nos produtos que foram objetos de estudo deste trabalho e procurar evidenciar a relação entre o quantitativo encontrado para esta toxina e a reação inflamatória observada.

O resultado do conteúdo de Toxina Pertussis ativa na vacina DTP-1 foi expresso em relação ao resultado de uma preparação de referência (Toxina Pertussis NIBSC 90/518) com conteúdo de Toxina Pertussis de 128 ng/mL.

Utilizando-se de diluições seriadas com fator de diluição 2 com variação de 1/2 a 1/2048, observou-se que a vacina DTP-1 e a Toxina de Referência induziram a formação de clustering (aglomeração celular) nas diluições 1/60 e 1/32 respectivamente.

Com estes dados, podemos demonstrar de forma comparativa que o conteúdo de Toxina Pertussis ativa encontrado na vacina DTP-1 foi equivalente a 240 ng/mL como mostra a Tabela 1.

**Tabela 1**

<b>Relação entre a ocorrência do efeito clustering e o conteúdo de Toxina Pertussis Ativa (DTP-1)</b>		
	<b>Toxina Pertussis (128 ng/mL)</b>	<b>Vacina DTP 1</b>
<b>Efeito Clustering</b>	1/32	1/60
<b>Conteúdo de Toxina Pertussis</b>	4 ng/mL	240 ng/mL

#### *IV.1.2 Ensaio do Limulus Amebocyte Lisate (LAL) ou Ensaio de Endotoxina*

Com o objetivo de quantificar o conteúdo de endotoxina das vacinas utilizadas em nosso estudo e na tentativa de associar os resultados encontrados com a resposta inflamatória produzida pela vacina DTP procedemos a dosagem da endotoxina pelo método do LAL, empregado para a análise de todas as vacinas envolvidas em nosso estudo.

O valor referente ao conteúdo de endotoxina encontrado para a vacina DTP-1 está apresentado na tabela 2, associado ao valor da endotoxina de referência, da qual são utilizadas diluições sucessivas para que se possa fazer um estudo comparativo dos resultados obtidos com as diluições da vacina teste.

A presença de endotoxina neste ensaio é caracterizada por uma reação de gelificação também conhecida como “gel-clot” (reação de gelificação). Estes resultados estão relacionados à menor diluição em que observa-se a formação da reação de gelificação.

As diluições utilizadas variaram de 1/10 a 1/640.000 com fatores de diluição diferenciados, fator 10 nas quatro primeiras diluições e fator 2 nas diluições seguintes. A presença da reação de gelificação foi caracterizada pelo uso do sinal (+), indicando reação positiva e a ausência da reação de gelificação foi caracterizada pelo sinal (-), indicando reação negativa.

Assim, para a vacina DTP-1, de acordo com os valores apresentados na tabela 2 foi observada a reação de gelificação ou reação positiva (+) até a diluição 1/40.000.

Expressando este resultado de forma quantitativa em relação a endotoxina de referência, podemos estimar que o conteúdo de endotoxina está compreendido no intervalo que correspondente aos valores:  $> 5.000$  e  $< 10.000$  UE/mL (UE = Unidades de Endotoxina) como demonstrado. Desta forma, o conteúdo máximo de endotoxina encontrado na vacina DTP-1 foi expresso, de forma comparativa, como sendo de 10.000 UE/mL, como mostra a Tabela 2.

Vale ressaltar que valores máximos aceitáveis para o conteúdo de endotoxina na vacina DTP não estão descritos em monografias de farmacopéias ou em requerimentos internacionais.

**Tabela 2**  
**Relação entre a ocorrência do efeito gel clot e o conteúdo de Endotoxina (DTP-1)**

Endotoxina de Referência 0,125	Vacina DTP 1
<b>Efeito</b> <b>Gel clot</b>	1/40.000 (+)
	1/80.000 (-)
<b>Conteúdo</b> <b>de</b> <b>Endotoxina</b>	>5.000 UE/mL
	< 10.000 UE/mL

#### IV.1.3 Edema de Pata

A injeção subcutânea ou intramuscular da vacina DTP é capaz de promover tanto em modelos animais como no ser humano, a formação de um edema com intenso eritema no sítio da inoculação, podendo a evolução desta reação ser acompanhada ao longo do tempo.

Em nosso estudo, procuramos investigar a formação deste edema, que está relacionado à capacidade da vacina em produzir uma reação adversa, descrita como reação local, quantificando esta reação através da tomada da medida do edema de pata.

Verificamos a capacidade da vacina DTP-1 em induzir o edema de pata com a aplicação de uma dose da vacina correspondente a 50 µL e a medida do edema produzido foi expressa como volume de edema em µL.

O perfil da cinética deste edema demonstrou uma curva crescente, na qual destaca-se um aspecto característico: um decaimento no período compreendido entre 6 e 12 horas, como demonstrado no gráfico 1. Após este decaimento, observou-se uma intensa reação inflamatória com crescente aumento do edema observado até o período de 96 horas.

Esta reação indicou a capacidade da vacina DTP-1 em induzir uma intensa reação local na pata de camundongos inoculados. A causa desta reação, possivelmente, esta associada ao conteúdo de toxina pertussis ativa e ao conteúdo de LPS encontrados nesta vacina, como veremos a seguir.

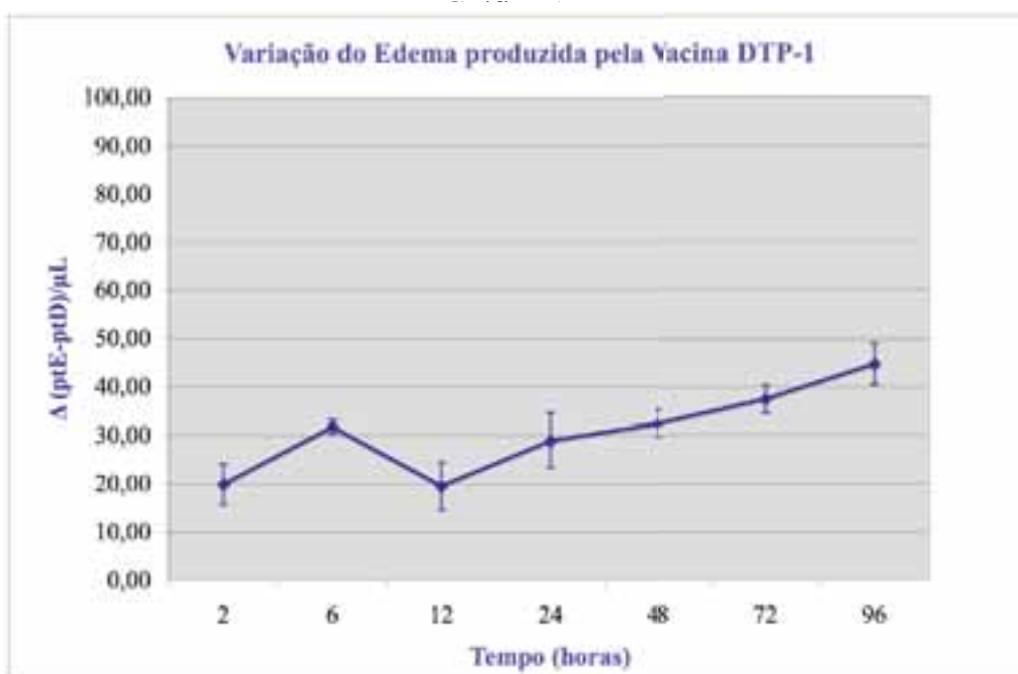
Os resultados encontrados foram expressos como a diferença (ou delta [Δ]) entre a pata esquerda (inoculada) e a pata direita (não inoculada) que funcionou como controle. A medida do edema para DTP-1 esta demonstrada na Tabela 3.

Tabela 3

Vacina DTP 1 - Valores Médios da Medida do Edema de Pata							
	2h	6h	12h	24h	48h	72h	96h
	N=18	N=18	N=18	N=18	N=18	N=18	N=18
$\Delta(\text{ptE-ptD})/\mu\text{L}$							
Média	19,94	31,77 <sup>a</sup>	19,55 <sup>b</sup>	28,94 <sup>a,c</sup>	32,50 <sup>a,c</sup>	37,55 <sup>a,b,c,d,e</sup>	44,83 <sup>a,b,c,d,e,f</sup>
Desvio	±4,242	±1,414	±4,949	±5,656	±2,828	±2,828	±4,242

Valores analisados pelo método de Kruskal-Wallis seguido pelo método U de Mann-Whitney. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os valores de edema observados nos intervalos de tempo são designadas como segue: a 2h; b 6h; c 12h; d 24h; e 48h e f 72h. ptE – ptD = diferença entre a pata esquerda e a pata direita.

A cinética do edema produzido em relação ao tempo está também representada no Gráfico 1.



O Gráfico 1 apresenta a variação do edema produzido pela vacina DTP 1. Os valores médios do edema e os desvios apresentados estão relacionados ao  $\Delta$ : diferença entre a pata esquerda e a pata direita. A pata direita funcionou como controle da medida do edema e não foi inoculada.

#### IV.1.4 Análise Histopatológica

O enfoque principal desta análise foi a verificação do envolvimento tecidual (epitelial e muscular) na reação inflamatória local produzida por cada um dos produtos testados.

Na análise histopatológica das patas controle em microscópio não se observou alterações nos diferentes planos do tecido epitelial bem como na camada muscular nos diferentes intervalos de tempo em que os animais foram sacrificados. Figura 5, A e B.

Ao exame das lâminas das patas dos inoculadas com a vacina DTP-1, nos diferentes períodos de tempo observou-se as seguintes alterações:

No intervalo de 2 horas após o tratamento, a análise microscópica revelou discreta reação inflamatória caracterizada por edema, congestão e infiltrado de polimorfonucleares na derme como mostra a Figura 6, A e B.

No intervalo de 6 horas após o tratamento, a análise histopatológica revelou evolução do processo inflamatório com aumento do edema, do infiltrado de polimorfonucleares e o surgimento de células mononucleadas na derme. Na camada muscular notou-se infiltrado de polimorfonucleares e presença de exsudato purulento, como mostra a Figura 7, A e B.

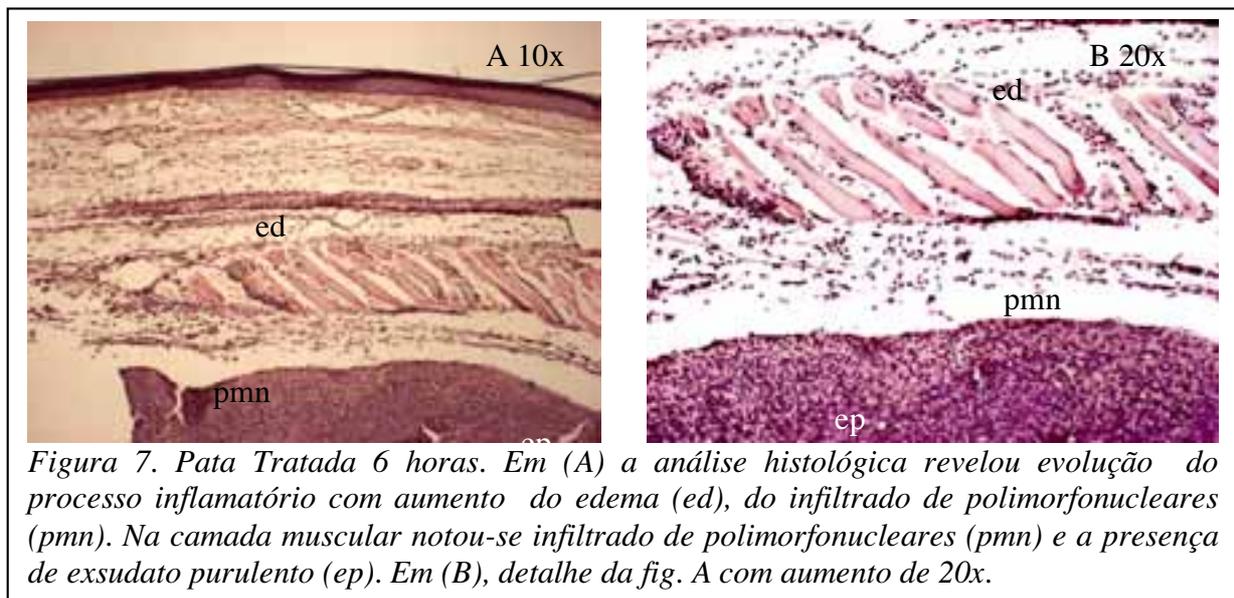
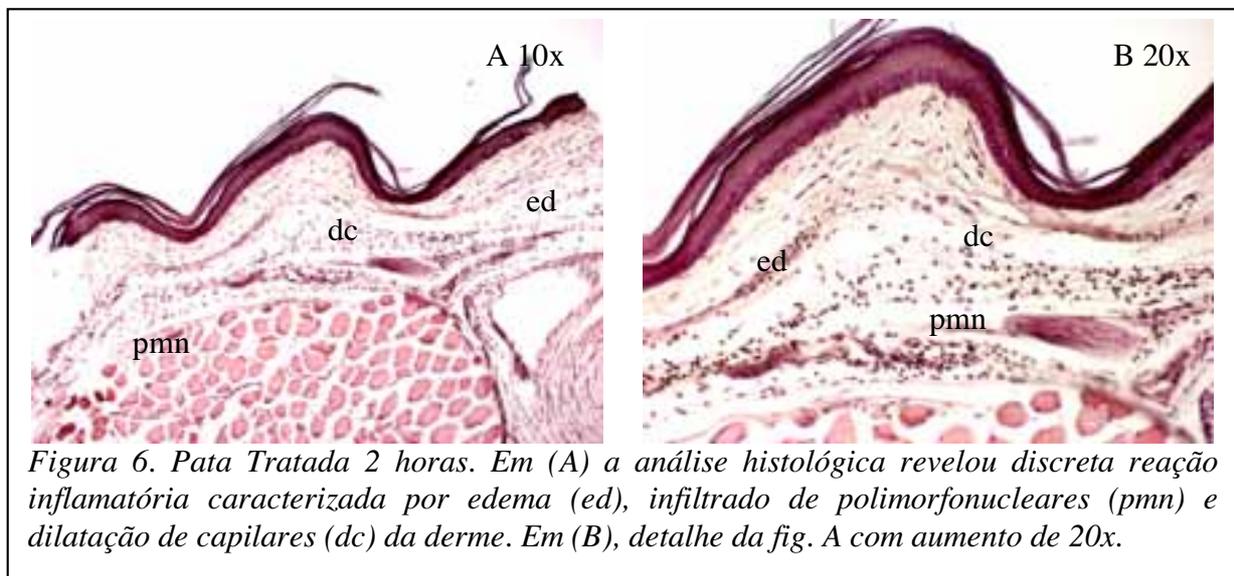
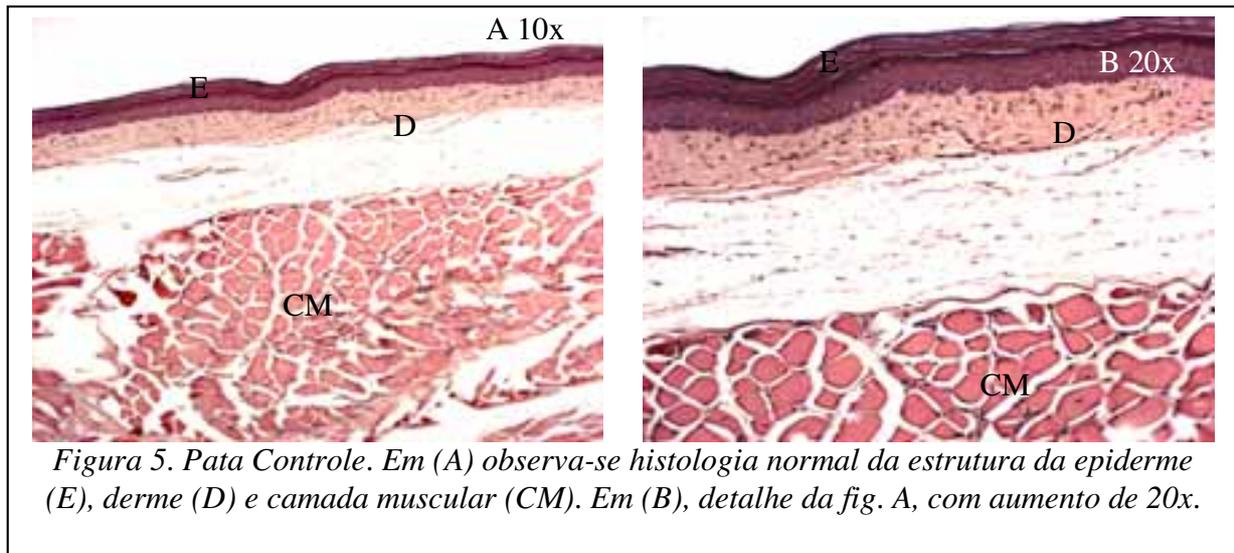
No intervalo de 24 horas após o tratamento, a imagem histológica é idêntica a de 6 horas, porém percebe-se um aumento de células inflamatórias tanto no nível da derme como na camada muscular, como mostra a Figura 8, A e B.

No intervalo de 48 horas após o tratamento, observou-se reação inflamatória semelhante a leitura de 24 horas, como mostra a Figura 9, A e B.

No intervalo de 72 horas após o tratamento, a análise microscópica revelou intenso infiltrado de polimorfonucleares e aumento significativo de células mononucleadas na derme e na camada muscular, onde também observou-se a presença de exsudato purulento e lesão de fibras musculares (necrose), como mostra a Figura 10, A e B.

No intervalo de 96 horas após o tratamento o exame microscópico revelou regressão do edema, porém progressão do infiltrado inflamatório e necrose de fibras musculares, como mostra a Figura 11, A e B.

## Histologia da reação inflamatória produzida pela vacina DTP-1



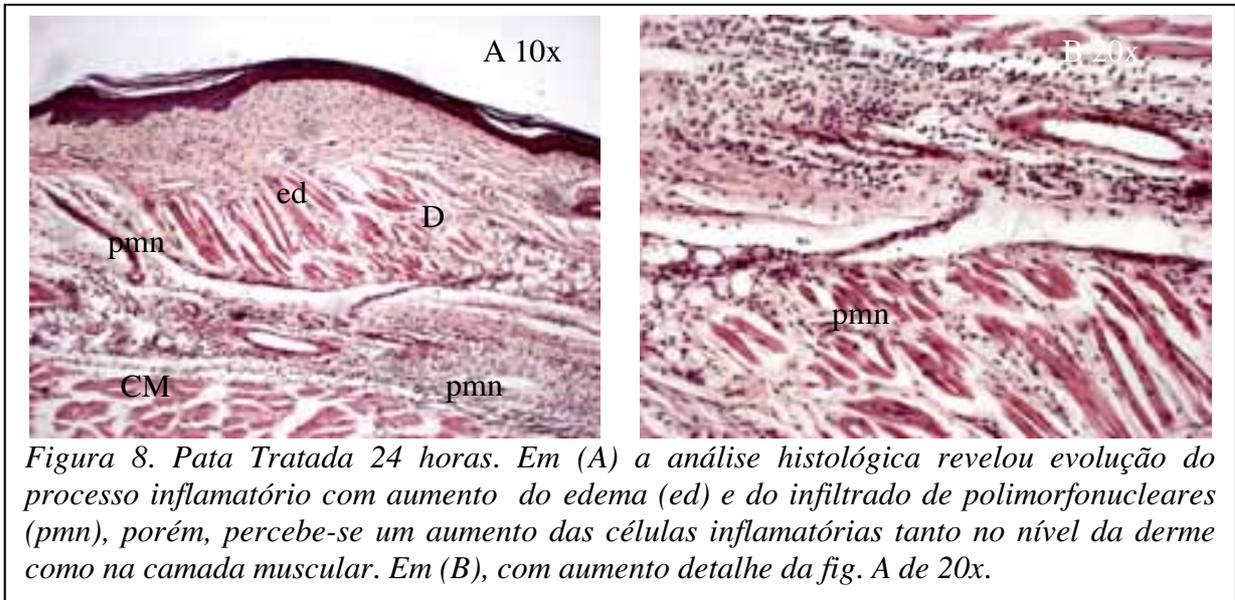


Figura 8. Pata Tratada 24 horas. Em (A) a análise histológica revelou evolução do processo inflamatório com aumento do edema (ed) e do infiltrado de polimorfonucleares (pmn), porém, percebe-se um aumento das células inflamatórias tanto no nível da derme como na camada muscular. Em (B), com aumento detalhe da fig. A de 20x.

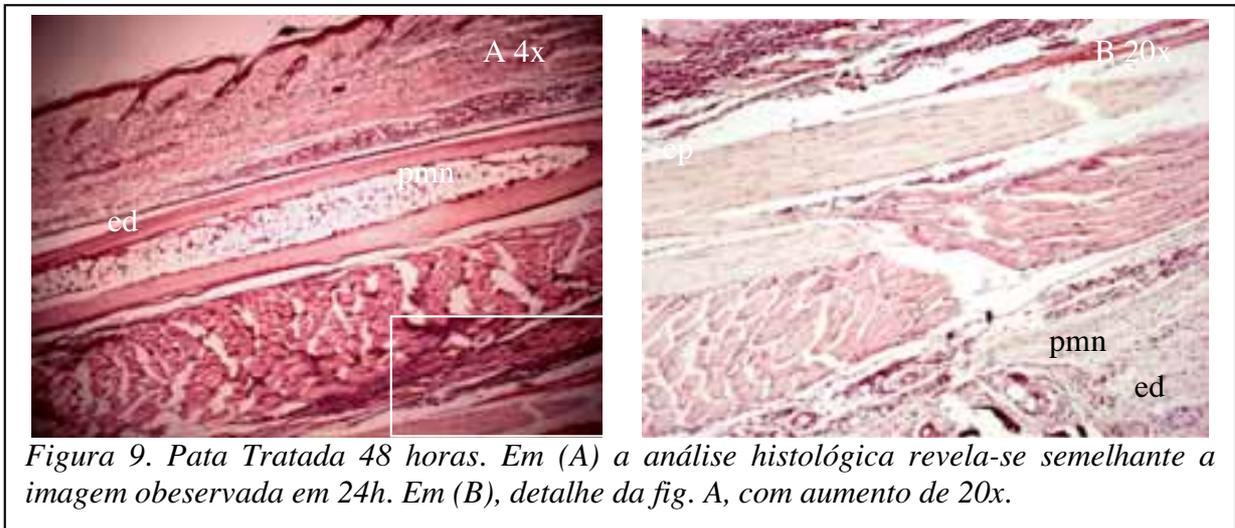


Figura 9. Pata Tratada 48 horas. Em (A) a análise histológica revela-se semelhante a imagem observada em 24h. Em (B), detalhe da fig. A, com aumento de 20x.

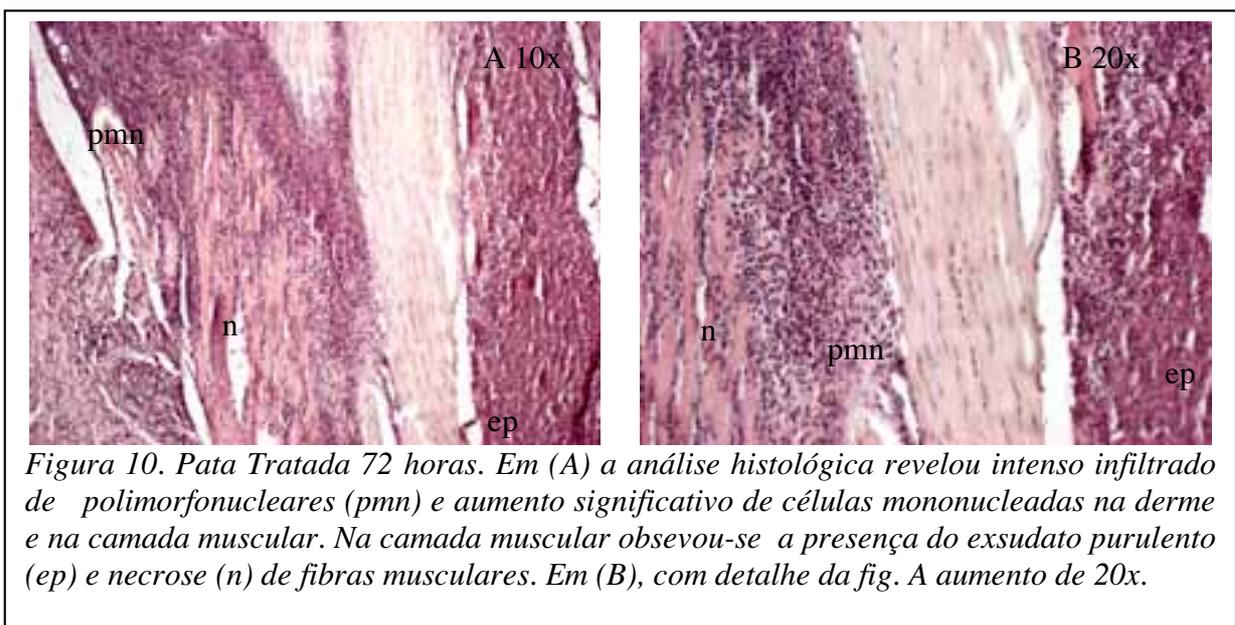
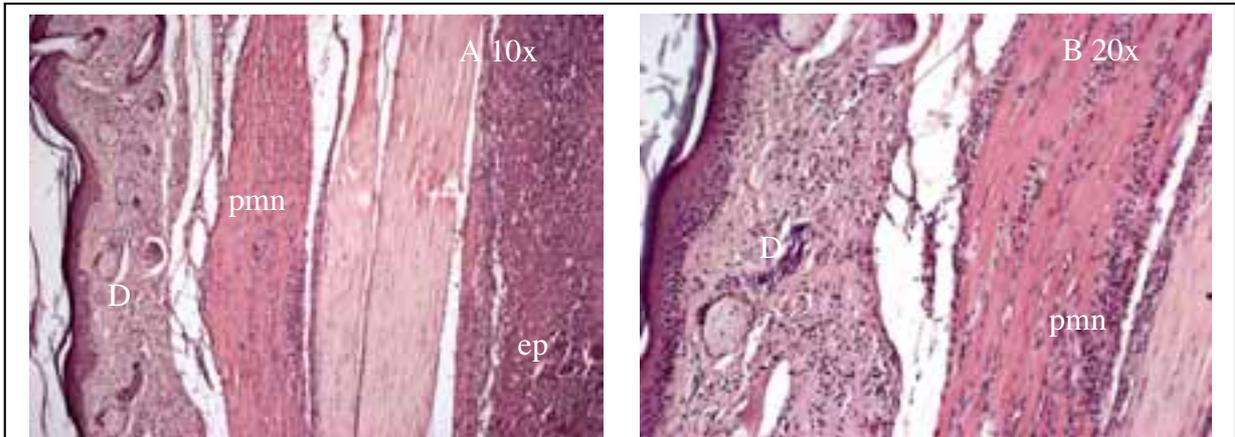


Figura 10. Pata Tratada 72 horas. Em (A) a análise histológica revelou intenso infiltrado de polimorfonucleares (pmn) e aumento significativo de células mononucleadas na derme e na camada muscular. Na camada muscular observou-se a presença do exsudato purulento (ep) e necrose (n) de fibras musculares. Em (B), com detalhe da fig. A aumento de 20x.



*Figura 11. Pata Tratada 96 horas. Em (A) a análise histológica revelou regressão do edema na derme (D) acompanhado de alteração na morfologia do tecido conjuntivo, progressão do infiltrado inflamatório (pmn) e presença de exsudato purulento (ep). Em (B), detalhe da fig. A com aumento de 20x.*

#### IV.1.5 Leucometria Total e Diferencial

Neste estudo os resultados dos leucócitos totais e específicos foram avaliados em 18 (dezoito) animais utilizados para o ensaio de cada produto. Cada animal foi avaliado em dois momentos distintos: previamente ao tratamento e 96 horas após o mesmo.

Como já foi observado em vários estudos, uma característica da infecção causada pela *B. pertussis*, utilizada inclusive para o diagnóstico da coqueluche, é a produção de uma leucocitose com pronunciada linfocitose. Vários estudos têm demonstrado que a vacina DTP também é capaz de promover este mesmo tipo de resposta.

Desta forma procuramos investigar a população de células sanguíneas da série branca, caracterizando o número dos leucócitos totais e o percentual específico das populações celulares com o emprego de uma dose correspondente a 50 µL da vacina, por via subcutânea aplicada na pata de camundongos.

Este procedimento de contagem das células foi realizado antes da aplicação da vacina DTP-1 e após ter decorrido o intervalo de 96 horas da aplicação desta vacina. Os valores apresentados na Tabela 4 representam o momento pré-inoculação e pós-inoculação.

Como observado na Tabela 4, em nosso estudo não foi evidenciada uma linfocitose pronunciada, normalmente descrita como induzida pelo conteúdo da toxina pertussis ativa existente na vacina. A partir dos resultados encontrados foi possível observar uma alteração do conteúdo da população celular, com acentuado aumento do conteúdo de neutrófilos quando comparando aos valores obtidos antes da aplicação da vacina.

Pelo menos dentro do período de 96 horas, nosso estudo indicou que existe um aumento do número de células leucocitárias, com neutrofilia e discreto aumento do número absoluto dos linfócitos e dos monócitos, como mostra a Tabela 4.

**Tabela 4**  
Análise dos Leucócitos antes e após o tratamento com a vacina DTP-1

	Bastões	Neutrófilos	Monócitos	Basófilos	Eosinófilos	Linfócitos	Leucócitos
<b>0h</b>							
N	75±98	4043±463	305±119	0±0	138±234	7550±970	12111±1342
%	0,7±0,9	33,4±2,3	2,6±1,0	0±0	1,1±1,8	62,5±3,0	
<b>96h</b>							
N	84±140	7806±1386*	486±273*	0±0	76±120	8916±1379*	17244±255*
%	0,4±0,7	45,2±3,1*	2,7±1,2	0±0	0,4±0,7	51,8±3,4*	

Valores: média ± DP (N=18) Os valores absolutos foram analisados pelo teste t de Student. Todos os outros parâmetros foram analisados pelo método U de Mann-Whitney. Em todos os casos, a diferença entre 0h e 96h foi considerada como estatisticamente significativa (\*) quando p < 0,05.

#### IV.1.6 Análise das Citocinas

Dados da literatura sustentam que a vacina DTP é capaz de produzir uma toxinfecção. A partir deste pressuposto, investigações sobre a natureza das toxinas produzidas pela *B. pertussis* e das interações desta com as células do hospedeiro têm sido conduzidas no intuito de elucidar este processo para que possam ser melhor compreendidas as causas das reações adversas produzidas pelos antígenos produzidos por este microorganismo.

A vacina DTP possui a característica de produzir o mesmo tipo de reação encontrado na doença e esta reatogenicidade tem relação direta com a resposta inflamatória produzida pela vacina.

Investigações sobre a natureza da resposta inflamatória induzida pela vacina DTP têm demonstrado que a endotoxina de bactérias Gram negativas constitui-se de um bom exemplo de modelo para a investigação do papel de citocinas pró-inflamatórias no controle de infecções bacterianas. Neste aspecto, na infecção causada pela *B. pertussis* ocorre um número de complicações sistêmicas resultado da transcrição de IL-1 e TNF- $\alpha$  e da expressão da IL-6 pelo hipocampo e hipotálamo (Chistine *et al.*, 2000), além da produção de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6 e TGF- $\beta$  (Remoué *et al.*, 1997).

Com base nas evidências descritas acima, procuramos investigar o perfil das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , através de sua quantificação pelo método de ELISA.

Na apresentação deste projeto de investigação acreditávamos que os níveis destas citocinas no sangue de animais imunizados, durante a fase aguda do processo inflamatório deveria demonstrar um aumento significativo destas citocinas em comparação com os resultados obtidos de animais normais.

Para este estudo injetamos 50  $\mu$ L de vacina por via subcutânea na pata de camundongos, e seguindo a cinética do edema induzido obtivemos o plasma dos animais nos períodos de 2, 6, 24, 48, 72 e 96 horas, para que pudesse ser efetuada a quantificação das citocinas.

Nas condições experimentais do presente estudo não encontramos níveis detectáveis de IL-1 e TNF- $\alpha$  em nenhum dos cinco produtos estudados. Desta forma os dados relacionados a esta etapa do estudo não são demonstrados na seção dos resultados.

No entanto, encontramos níveis significativos de IL-6 para DTP-1, DTP-2 e para a Vacina de Referência.

Nos animais não tratados não foram observados níveis detectáveis de IL-1 , IL-6 e TNF- .

A vacina DTP-1 induziu um aumento nos níveis de IL-6, sobretudo nos intervalos de 2 horas e 6 horas. No Gráfico 2 está representada a variação temporal da concentração da citocina IL-6 para o produto DTP-1.

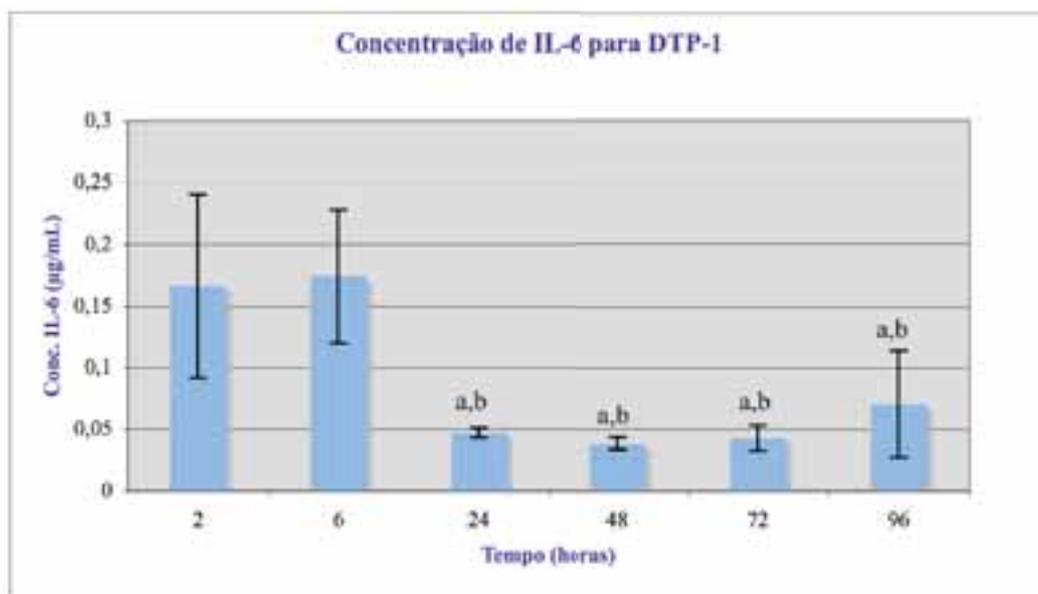


Gráfico 2. Dosagem da concentração de IL-6 por ELISA. Observa-se a concentração de IL-6 para os vários tempos nos quais foram feitas as medidas do edema. Os valores representam a média e o desvio padrão da leitura ótica realizada de cinco animais. O tempo 0 (zero) não foi demonstrado no gráfico, porque os valores para esta citocina estavam abaixo do limite de detecção. As diferenças entre os valores observados nos diversos intervalos de tempo foram analisadas por ANOVA, seguido por teste t de Student. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram designadas como a 2h, b 6h.

## ***IV.2 Resultados referentes a vacina DTP-2***

Seguindo o mesmo padrão de estudo da vacina DTP-1, procedemos a análise da vacina DTP-2. Os resultados dos ensaios aplicados serão apresentados a seguir.

### ***IV.2.1 Ensaio clustering em células CHO***

De forma comparativa em relação a uma toxina de Referência, o conteúdo de Toxina Pertussis ativa encontrado na vaciana DTP 2 foi equivalente a 2.560 ng/mL como mostra a Tabela 5.

**Tabela 5**

<b>Relação entre a ocorrência do efeito clustering e o conteúdo de Toxina Pertussis Ativa (DTP-2)</b>		
	<b>Toxina Pertussis de Referência (128ng/mL)</b>	<b>Vacina DTP 2</b>
<b>Efeito Clustering</b>	1/32	1/640
<b>Conteúdo de Toxina Pertussis Ativa</b>	4ng/mL	2.560ng/mL

O valor encontrado para esta vacina foi comparativamente, cerca de 10 vezes maior do que o encontrado para a vacina DTP-1 (240 ng/mL).

### ***IV.2.2 Ensaio do Limulus Amebocyte Lisate (LAL) ou Ensaio de Endotoxina***

Assim como o observado para a vacina DTP-1, o conteúdo máximo de endotoxina encontrado na vacina DTP 2 foi de 10.000 UE/mL, como demonstrado na Tabela 6.

**Tabela 6**

<b>Relação entre a ocorrência do efeito gel clot e o conteúdo de Endotoxina (DTP-2)</b>		
	<b>Endotoxina de Referência (<math>\bar{x}</math>=0,125)</b>	<b>Vacina DTP 2</b>
<b>Efeito Gel clot</b>		1/40.000 (+)
		1/80.000 (-)
<b>Conteúdo de Endotoxina</b>	0,125 UE/mL	>5.000 UE/mL
		< 10.000 UE/mL

### IV.2.3 Edema de Pata

Os resultados da medida do edema estão sempre expressos como a diferença entre a pata esquerda e a pata direita, os valores da medida do edema de pata para a vacina DTP-2, estão demonstrados na Tabela 7.

Tabela 7

Vacina DTP 2 -Valores Médios da Medida do Edema de Pata							
	2h	6h	12h	24h	48h	72h	96h
	N=18	N=18	N=18	N=18	N=18	N=18	N=18
$\Delta(\text{ptE}-\text{ptD})/\mu\text{L}$							
<b>Média</b>	20,88	48,25 <sup>a</sup>	39,5 <sup>a,b</sup>	50,12 <sup>a,c</sup>	68,62 <sup>a,b,c,d</sup>	74,5 <sup>a,b,c,d,e</sup>	78,06 <sup>a,b,c,d,e,f</sup>
<b>Desvio</b>	$\pm 1,414$	$\pm 5,656$	$\pm 4,949$	$\pm 5,656$	$\pm 2,828$	$\pm 1,414$	$\pm 2,121$

Valores analisados pelo método de Kruskal-Wallis seguido pelo método U de Mann-Whitney. Diferenças significativas entre os valores de edema observados nos intervalos de tempo ( $p < 0,05$ ) são designadas como segue: a 2h; b 6h; c 12h; d 24h; e 48h e f 72h.  $\text{ptE} - \text{ptD}$  = diferença entre a pata esquerda e a pata direita.

A cinética do edema está demonstrada no Gráfico 3.



O Gráfico 3 apresenta a variação do edema produzido pela vacina DTP 2. Os valores médios do edema e os desvios apresentados estão relacionados ao  $\Delta$  (delta): diferença entre a pata esquerda e a pata direita. A pata direita funcionou como controle da medida do edema e não foi inoculada.

Assim como observado na DTP-1, na análise do edema de pata observamos uma curva crescente na qual destaca-se o mesmo aspecto característico: decaimento no período entre 6 e 12 horas como demonstrado no Gráfico 3. Após este decaimento

também foi observada uma intensa reação inflamatória com aumento crescente do edema observado até o período de 96 horas.

#### IV.2.4 Análise Histopatológica

Como demonstrado anteriormente, na análise histopatológica das patas controles em microscópio não se observou alterações nos diferentes planos do tecido epitelial bem como na camada muscular nos diferentes períodos em que foram sacrificados os animais. Figura 5, A e B, item IV.1.4.

Nas patas observadas foram registrados os seguintes achados para DTP-2:

No intervalo de 2 horas após o tratamento, a análise histopatológica revelou em nível de derme processo inflamatório caracterizado por congestão, edema e infiltrado de PMN. Figura 12, A e B.

No intervalo de 6 horas após o tratamento, a análise histopatológica revelou vacuolização citoplasmática de células do estrato espinhoso da epiderme. Na derme observou-se congestão, edema e expressivo infiltrado de PMN. Na camada muscular notou-se infiltrado de PMN e exsudato purulento. Figura 13, A e B.

No intervalo de 12 horas após o tratamento, a análise histopatológica mostrou a presença de infiltrado de PMN (exocitose) na camada córnea da epiderme. Na derme notou-se edema, congestão e aumento do infiltrado de PMN acompanhado de raras células mononucleadas. Na camada muscular observou-se infiltrado de PMN, macrófagos e exsudato purulento.

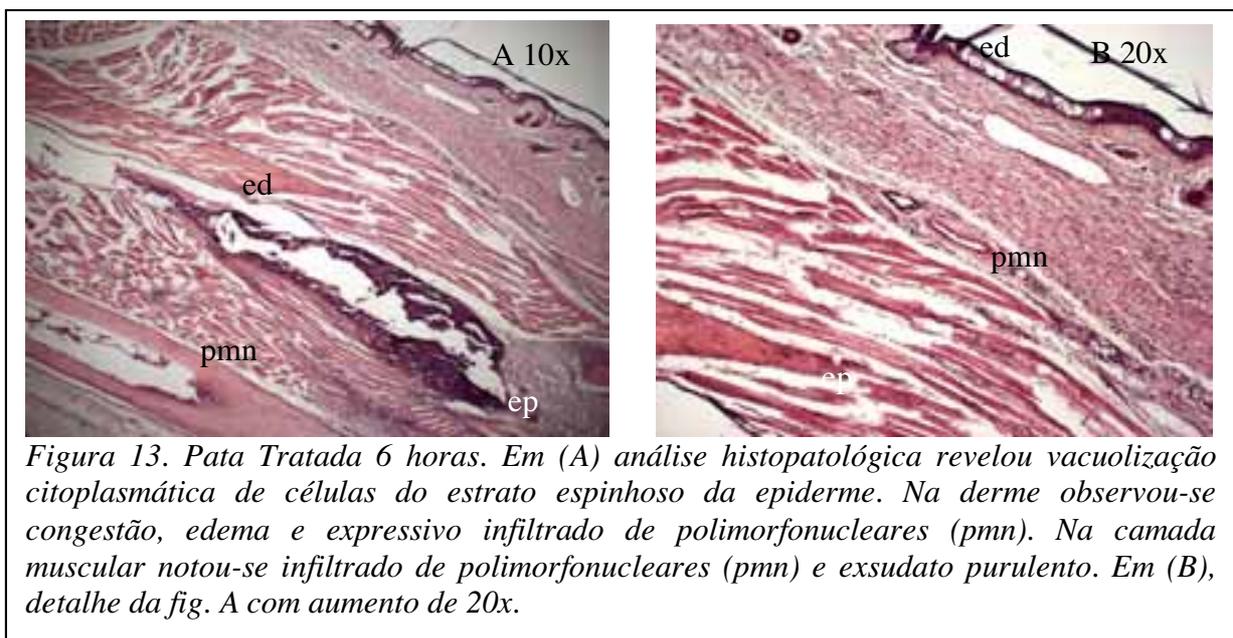
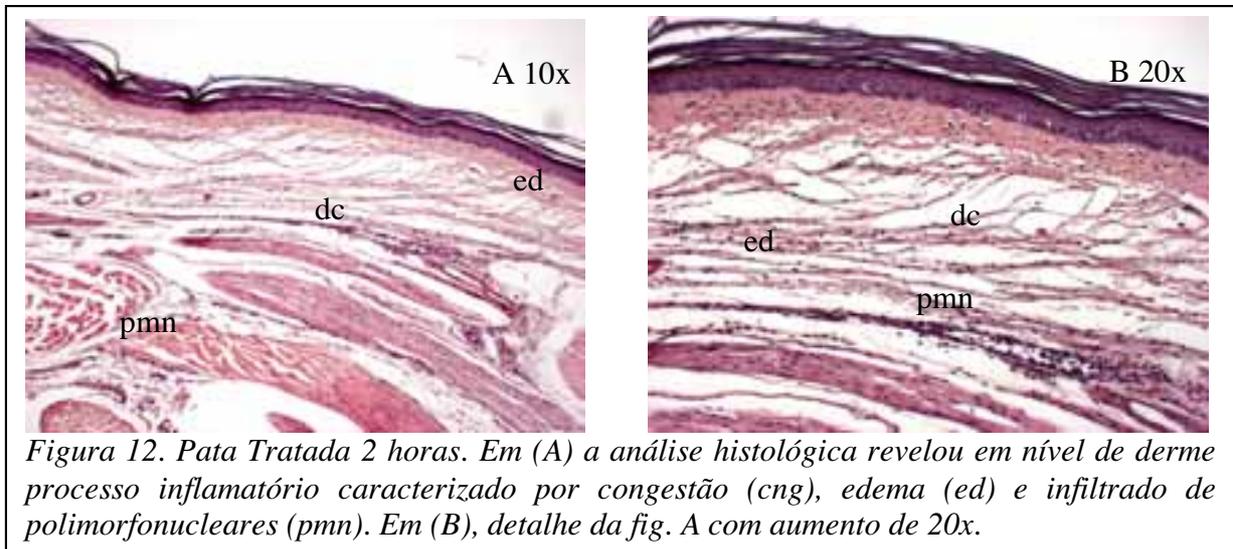
No intervalo de 24 horas após o tratamento, a análise histopatológica revelou no nível de epiderme exocitose e regressão do processo de vacuolização citoplasmática de células do estrato espinhoso. Na derme observou-se intenso infiltrado de PMN, edema e congestão. No nível de camada muscular notou-se infiltrado de PMN, necrose de fibras musculares e a presença de exsudato purulento. Figura 14.

No intervalo de 48 horas após o tratamento, a análise histopatológica revelou total regressão das alterações da epiderme. Na derme observou-se intenso infiltrado de PMN e considerável aumento no número de macrófagos. Na camada muscular observou-se intenso infiltrado de PMN, necrose de fibras musculares e a presença de exsudato purulento. Figura 15, A e B.

No intervalo de 72 horas após o tratamento, a análise histopatológica mostrou-se semelhante as observadas no período de 48 horas.

No intervalo de 96 horas após o tratamento, a análise histopatológica revelou quadro inflamatório semelhante ao observado no período de 48 horas. Figura 16, A e B.

### Histologia da reação inflamatória produzida pela vacina DTP-2



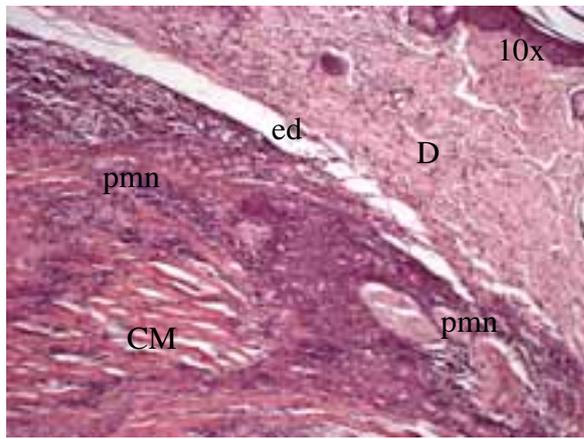


Figura 14. Pata Tratada 24 horas. A análise histológica revelou em nível de epiderme exocitose e regressão do processo de vacuolização citoplasmática de células do estrato espinhoso. Na derme observou-se intenso infiltrado de PMN, edema e congestão. Em nível de camada muscular notou-se infiltrado de PMN, necrose de fibras musculares e a presença de exsudato purulento.

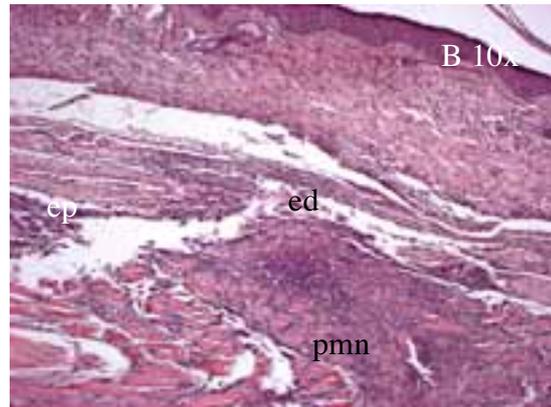
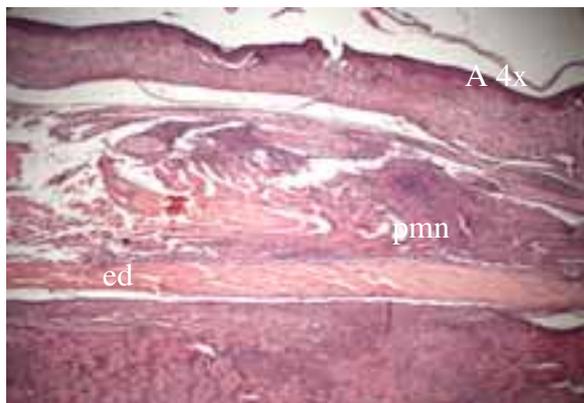


Figura 15. Pata Tratada 48 horas. Em (A) a análise histológica revelou total regressão das alterações da epiderme. Na derme observou-se intenso infiltrado de PMN e considerável aumento no número de macrófagos. Na camada muscular observou-se intenso infiltrado de PMN, necrose de fibras musculares e a presença de exsudato purulento.. Em (B), detalhe da fig. A, com aumento de 20x.

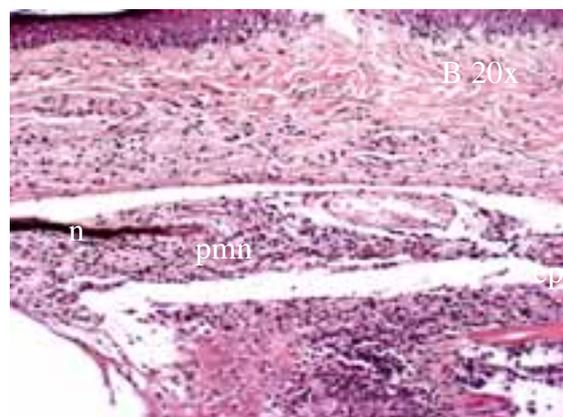
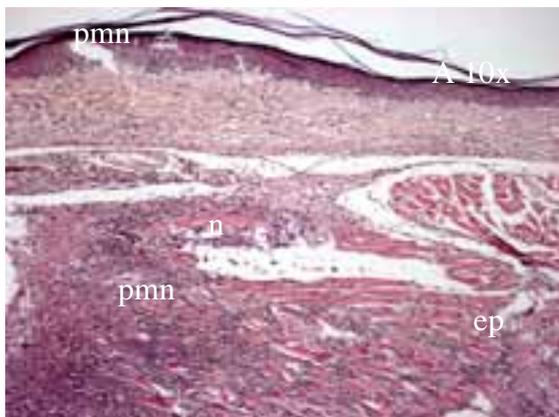


Figura 16. Pata Tratada 96 horas. Em (A) a análise histológica revelou quadro inflamatório semelhante ao observado no período de 48 horas. Em (B), detalhe da fig. A com aumento de 20x.

#### IV.2.5 Leucometria Total e Diferencial

Como na DTP-1, os leucócitos totais e específicos foram avaliados em 18 (dezoito) animais e cada um deles foi avaliado em dois momentos distintos: previamente ao tratamento e 96 horas após o mesmo. A dose correspondente foi de 50 $\mu$ L da vacina, por via subcutânea aplicada na pata de camundongos.

A contagem das células foi então realizada antes da aplicação da vacina DTP-2 e após terem decorridos 96 horas da aplicação desta vacina. Os valores apresentados na Tabela 8 representam os momentos pré-inoculação e pós-inoculação.

Como na vacina DTP-1, na vacina DTP-2 evidenciou-se acentuada leucocitose com aumento no número de neutrófilos e discreto aumento no número absoluto de monócitos e linfócitos.

**Tabela 8**  
**Análise dos Leucócitos antes e após o tratamento com a vacina DTP-2**

	Bastões	Neutrófilos	Monócitos	Basófilos	Eosinófilos	Linfócitos	Leucócitos
<b>0h</b>							
N	63 $\pm$ 81	3669 $\pm$ 446	311 $\pm$ 133	0 $\pm$ 0	49 $\pm$ 100	7107 $\pm$ 1074	11325 $\pm$ 982
%	0,6 $\pm$ 0,7	32,4 $\pm$ 2,4	2,8 $\pm$ 1,2	0 $\pm$ 0	0,4 $\pm$ 0,9	62,6 $\pm$ 6,5	
<b>96h</b>							
N	68 $\pm$ 131	10319 $\pm$ 117*	547 $\pm$ 293*	0 $\pm$ 0	76 $\pm$ 102	9556 $\pm$ 1478*	20444 $\pm$ 222*
%	0,3 $\pm$ 0,6	50,6 $\pm$ 4,1*	2,6 $\pm$ 1,3	0 $\pm$ 0	0,4 $\pm$ 0,5	46,7 $\pm$ 4,6*	

Valores: média  $\pm$  DP (N=18) Os valores absolutos foram analisados pelo teste t de Student. Todos os outros parâmetros foram analisados pelo método U de Mann-Whitney. Em todos os casos, a diferença entre 0h e 96h foi considerada como estatisticamente significativa (\*) quando p < 0,05.

#### IV.2.6 Análise das Citocinas

Neste estudo não encontramos níveis detectáveis de IL-1 e TNF- como mencionado anteriormente.

Injetamos 50  $\mu$ L da vacina DTP-2 por via subcutânea na pata dos camundongos, e seguindo a cinética do edema induzido obtivemos o plasma dos animais nos períodos de 2, 6, 24, 48, 72 e 96 horas, e procedemos a quantificação das citocinas da mesma forma como foi realizado com a vacina DTP-1.

Como a vacina DTP-1, a vacina DTP-2 induziu um aumento nos níveis de IL-6, sobretudo nos intervalos de 2 horas e 6 horas. No Gráfico 4 está representada a variação temporal da concentração da citocina IL-6 para o produto DTP-2.

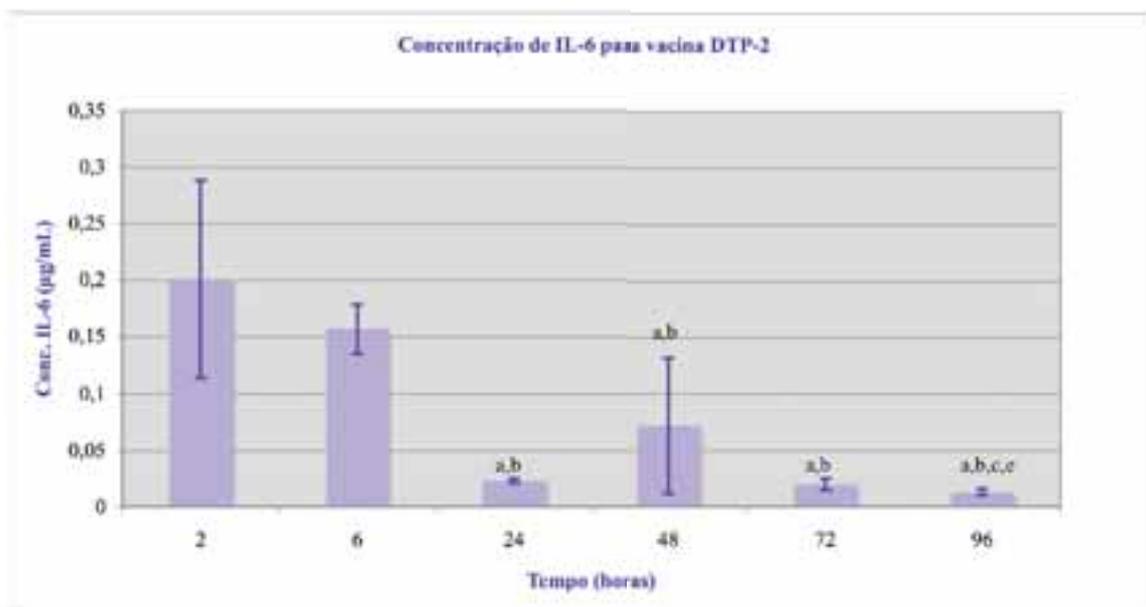


Gráfico 4. Dosagem da concentração de IL-6 por ELISA. Observa-se a concentração de IL-6 para os vários tempos nos quais foram feitas as medidas do edema. Os valores representam a média e o desvio padrão da leitura ótica realizada de cinco animais. O tempo 0 (zero) não foi demonstrado no gráfico, porque os valores para esta citocina estavam abaixo do limite de detecção. As diferenças entre os valores observados nos diversos intervalos de tempo foram analisadas por ANOVA, seguido por teste t de Student. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram designadas como a 2h, b 6, c 24h, e 72h.

### ***IV.3 Resultados obtidos com a Vacina de Referência (Ref)***

Repetindo o padrão de estudo da vacina DTP-1 e DTP-2, procedemos a análise de uma vacina de Referência e, os resultados dos ensaios aplicados para esta vacina serão demonstrados a seguir.

#### ***IV.3.1 Ensaio clustering em células CHO***

O conteúdo de Toxina Pertussis ativa encontrado na vacina de Referência foi equivalente a 3200 ng/mL como mostra a Tabela 9.

**Tabela 9**

**Relação entre a ocorrência do efeito clustering e o conteúdo de Toxina Pertussis Ativa (Vac. Ref.)**

	<b>Toxina Pertussis (128ng/mL)</b>	<b>Vacina de Referência</b>
<b>Efeito Clustering</b>	1/32	1/800
<b>Conteúdo de Toxina Pertussis</b>	4ng/mL	3200ng/mL

Este valor encontrado para o conteúdo de Toxina Pertussis foi maior do que os valores encontrados para a vacina DTP-1 (240ng/mL) e DTP-2 (2560ng/mL).

#### ***IV.3.2 Ensaio do Limulus Amebocyte Lisate (LAL) ou Ensaio de Endotoxina***

Com a vacina de Referência, foi observada a reação de gelificação ou reação positiva (+) até a diluição 1/640.000.

Expressando este resultado de forma quantitativa em relação a uma endotoxina padrão ou de referência, podemos estimar que o conteúdo de endotoxina está compreendido no intervalo que correspondente aos valores > 80.000 e < 160.000 como demonstrado na Tabela 10.

**Tabela 10**  
**Relação entre a ocorrência do efeito gel clot e o conteúdo de Endotoxina - Ref**

Endotoxina de Referência $\bar{x}=0,125$		Vacina de Referência
<b>Efeito Gel clot</b>		1/640.000 (+)
		1/1.280.000 (-)
<b>Conteúdo de Endotoxina</b>	0,125UE/mL	>80.000 UE/mL
		< 160.000 UE/mL

O conteúdo máximo de endotoxina encontrado na Vacina de Referência, expresso de forma comparativa com uma endotoxina conhecida, foi de 160.000 UE/mL. Este resultado foi 16 vezes maior do que o encontrado nas vacinas DTP-1 (10.000 UE/mL) e DTP-2 (10.000 UE/mL).

#### IV.3.3 Edema de Pata

Os resultados para a medida do edema de pata foram expressos como a diferença (ou delta [  $\Delta$  ]) entre a pata esquerda e a pata direita, da mesma forma que as outras vacinas testadas. Os valores das medidas obtidos para esta vacina estão expressos na Tabela 11. A cinética do edema produzido em relação ao tempo pode ser visualizada no Gráfico 5.

**Tabela 11**  
**Vacina de Referência -Valores Médios da Medida do Edema de Pata**

	2h N=18	6h N=18	12h N=18	24h N=18	48h N=18	72h N=18	96h N=18
<b><math>\Delta(pE-ptD)</math>: mL</b>							
<b>Média</b>	13,44	32,16 <sup>a</sup>	46,77 <sup>a,b</sup>	61,33 <sup>a,b,c</sup>	83,88 <sup>a,b,c,d</sup>	94,61 <sup>a,b,c,d,e</sup>	82,44 <sup>a,b,c,d,f</sup>
<b>Desvio</b>	±2,121	±2,828	±9,803	±12,409	±0,707	±0,707	±4,853

Valores analisados pelo método de Kruskal-Wallis seguido pelo método U de Mann-Whitney. Diferenças significativas entre os valores de edema observados nos intervalos de tempo ( $p < 0,05$ ) são designadas como segue: a 2h; b 6h; c 12h; d 24h; e 48h e f 72h.  $\Delta pE - ptD$  = diferença entre a pata esquerda e a pata direita.



O Gráfico 5 apresenta a variação do edema produzido pela Vacina de Referência. O  $\Delta$  representa os valores médios do edema e desvios relacionados a diferença entre a pata esquerda que foi inoculada e a pata direita não inoculada. (O decaimento da curva possivelmente está relacionado a perda de exsudato purulento observada na análise visual da pata dos camundongos utilizados no ensaio).

Na curva da cinética do edema produzido pela vacina de Referência não se evidenciou o decaimento que havia ocorrido no período de 12 horas após o tratamento com as vacinas DTP-1 e DTP-2. Este fato pode estar relacionado com a alta concentração de LPS encontrada para este produto.

#### IV.3.4 Análise Histopatológica

Da mesma forma que se procedeu para as vacinas DTP-1 e DTP-2, na análise histopatológica das patas controles da vacina de Referência em microscópio não se observou alterações nos diferentes planos do tecido epitelial bem como na camada muscular nos diferentes períodos em que foram sacrificados os animais. Figura 10, A e B, item IV.1.4.

No intervalo de 2 horas, a análise histopatológica revelou no nível de epiderme vacuolização citoplasmática de células do estrato espinhoso. Na derme observou-se edema, congestão e infiltrado de PMN. Figura 17, A e B.

No intervalo de 6 horas, a análise histopatológica revelou intensificação do processo de vacuolização de células do estrato espinhoso mostrando ruptura da membrana celular. Na derme observou-se edema, congestão e infiltrado inflamatório, o qual mostrou-se presente na camada muscular. Figura 18, A e B.

No intervalo de 12 horas, a análise histopatológica mostrou a presença de infiltrado de PMN (exocitose) na camada córnea da epiderme. Na derme notou-se edema, congestão e aumento do infiltrado de PMN acompanhado de raras células mononucleadas. Na camada muscular observou-se infiltrado de PMN, macrófagos e exsudato purulento. Figura 19, A e B.

No intervalo de 24 horas, a análise histopatológica revelou no nível de epiderme foco de erosão, exocitose e regressão do processo de vacuolização citoplasmática de células do estrato espinhoso. Na derme observou-se intenso infiltrado de PMN, edema e congestão. Em nível de camada muscular notou-se infiltrado de PMN e a presença de exsudato purulento. Figura 20, A e B.

No intervalo de 48 horas, a análise histopatológica revelou total regressão das alterações da epiderme. Na derme observou-se intenso infiltrado de PMN e considerável aumento no número de macrófagos. Na camada muscular observou-se intenso infiltrado de PMN, necrose de fibras musculares e a presença de exsudato purulento. Figura 21, A e B.

No intervalo de 72 horas, as imagens microscópicas se assemelham as observadas no período de 48 horas. Figura 22.

No intervalo de 96 horas, a análise microscópica revelou quadro inflamatório semelhante ao observado no período de 48 horas. Figura 23, A e B.

## Histologia da reação inflamatória produzida pela vacina de Referência

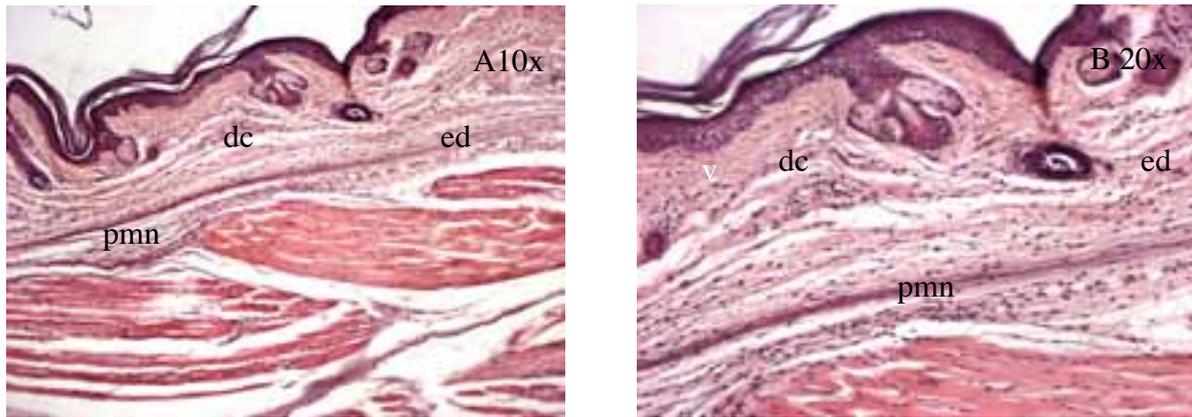


Figura 17. Pata Tratada 2 horas. Em (A) a análise histológica revelou em nível de epiderme vacuolização (v) citoplasmática de células do estrato espinhoso. Na derme observou-se edema (e), dilatação de capilares (dc) e infiltrado de polimorfonucleares (pmn). Em (B), detalhe da fig. A com aumento de 20x.

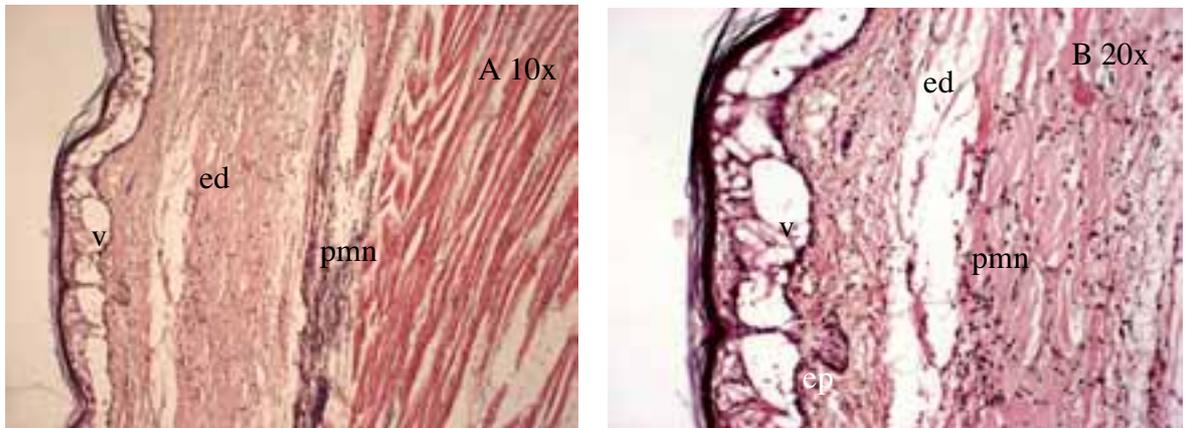


Figura 18. Pata Tratada 6 horas. Em (A) a análise histológica revelou intensificação do processo de vacuolização (v) de células do estrato espinhoso mostrando ruptura da membrana celular. Na derme observou-se edema e infiltrado de polimorfonucleares (pmn), o qual mostrou-se também presente na camada muscular. Em (B), detalhe da fig. A com aumento de 20x.

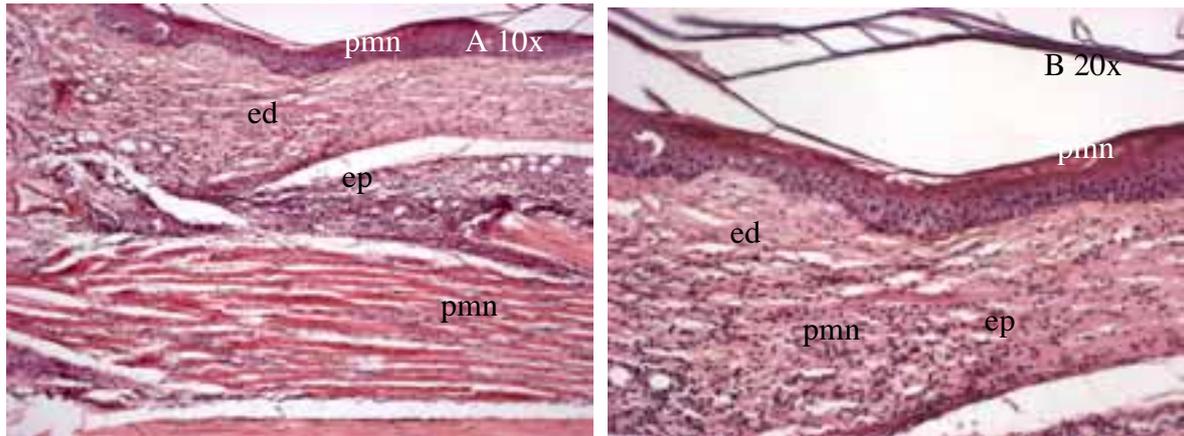


Figura 19. Pata Tratada 12 horas. Em (A) a análise histológica revelou a presença de infiltrado de polimorfonucleares (pnn) em apoptose na camada córnea da epiderme. Na derme notou-se edema (ed) e aumento do infiltrado polimorfonucleares (pnn) acompanhado de raras células mononucleadas. Na camada muscular observou-se infiltrado de polimorfonucleares (pnn) e exsudato purulento (ep). Em (B), detalhe da figura A com aumento de 20x.

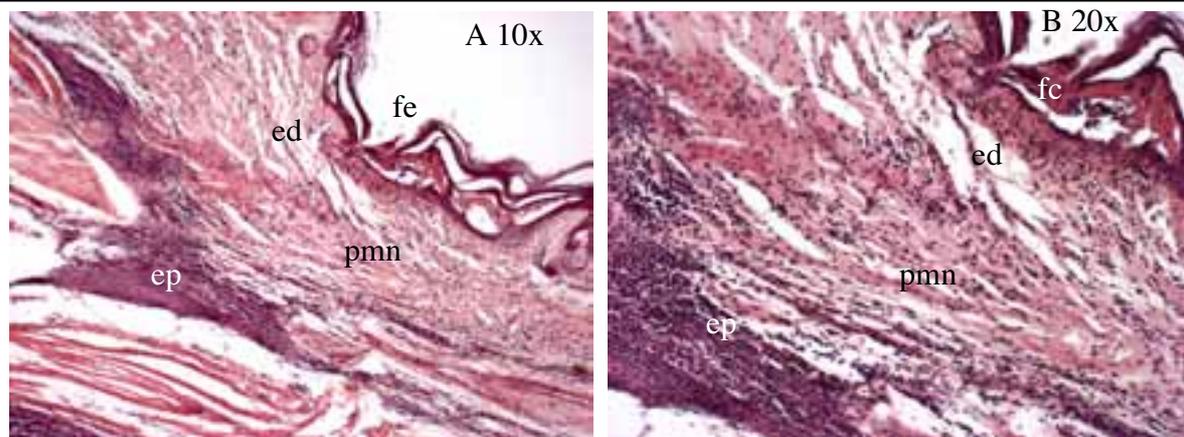


Figura 20. Pata Tratada 24 horas. Em (A) a análise histológica revelou em nível de epiderme foco de erosão (fe). Na derme observou-se intenso infiltrado de polimorfonucleares (pnn) e edema (ed). Em nível de camada muscular notou-se infiltrado de polimorfonucleares (pnn) e a presença de exsudato purulento (ep). Em (B), detalhe da fig. A, com aumento de 20x.

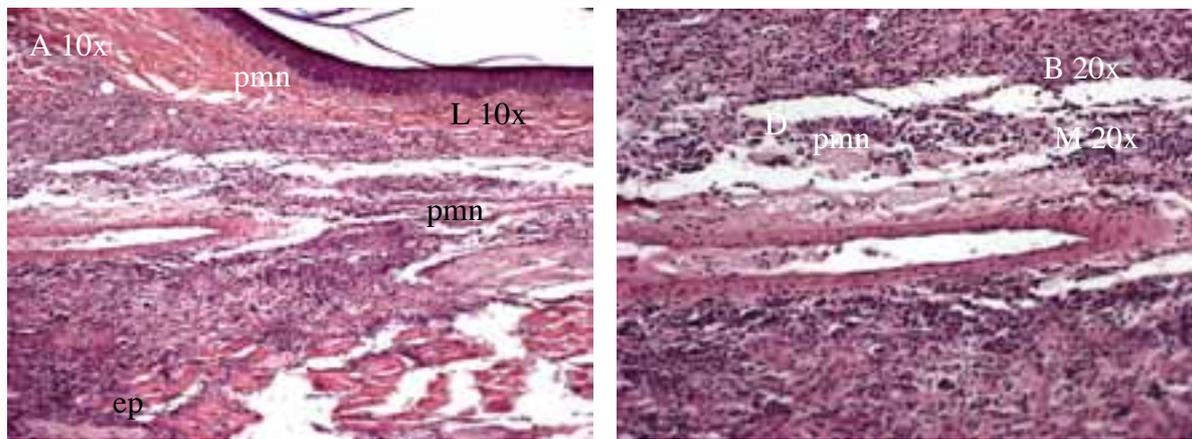


Figura 21. Pata Tratada 48 horas. Em (A) a análise histológica revelou total regressão das alterações da epiderme. Na derme observou-se intenso infiltrado de polimorfonucleares (pmn). Na camada muscular observou-se intenso infiltrado de polimorfonucleares (pmn) e a presença de exsudato purulento (ep). Em (B), detalhe da fig. A, com aumento de 20x.

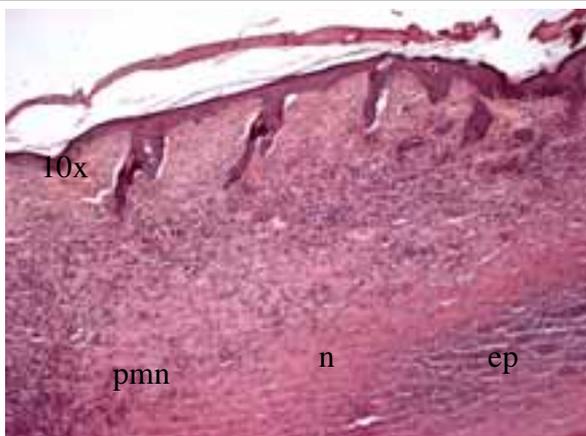


Figura 22. Pata Tratada 72 horas. A análise histológica revelou na derme intenso infiltrado de polimorfonucleares (pmn). Na camada muscular observou-se intenso infiltrado de polimorfonucleares (pmn), necrose (n) de fibras musculares e a presença de exsudato purulento (ep).

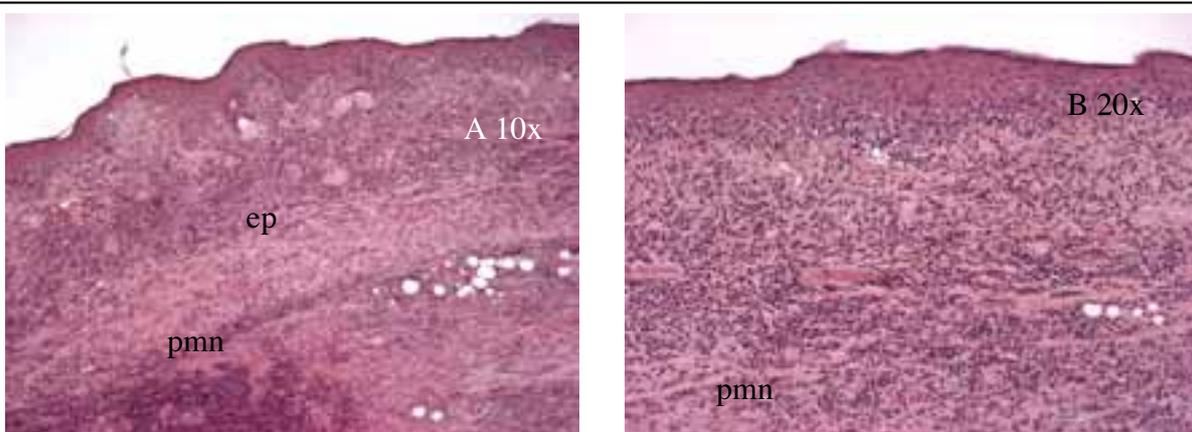


Figura 23. Pata Tratada 96 horas. Em (A) a análise histológica revelou na derme intenso infiltrado de polimorfonucleares (pmn). Na camada muscular observou-se intenso infiltrado de polimorfonucleares (pmn), necrose (n) de fibras musculares e a presença de exsudato purulento (ep). Em (B), detalhe da figura A, com aumento de 20x.

#### IV.3.5 Leucometria Total e Diferencial

Como na DTP-1 e na DTP-2, os leucócitos totais e específicos foram avaliados em 18 (dezoito) animais e cada um deles foi avaliado em dois momentos distintos: previamente ao tratamento e 96 horas após o mesmo. A dose correspondente foi de 50 $\mu$ L da vacina, por via subcutânea aplicada na pata de camundongos.

A contagem das células foi então realizada antes da aplicação da vacina DTP-2 e após terem decorridos 96 horas da aplicação desta vacina. Os valores apresentados na Tabela 12 representam o momento pré-inoculação e pós-inoculação.

Embora a natureza dos efeitos sobre as células sanguíneas sejam bastante similares àqueles observados para DTP-1 e DTP-2, o tratamento com a vacina de Referência não induziu aumento estatisticamente significativo no número absoluto de linfócitos. A leucocitose aqui observada é ainda mais acentuada do que aquela induzida pelas vacinas DTP-1 e DTP-2.

**Tabela 12**  
**Análise dos Leucócitos antes e após o tratamento com a a vacina de Referência**

	Bastões	Neutrófilos	Monócitos	Basófilos	Eosinófilos	Linfócitos	Leucócitos
<b>0h</b>							
N	46 $\pm$ 82	3774 $\pm$ 487	259 $\pm$ 133	0 $\pm$ 0	40 $\pm$ 82	7551 $\pm$ 440	11611 $\pm$ 417
%	0,4 $\pm$ 0,7	32,4 $\pm$ 3,5	2,2 $\pm$ 1,1	0 $\pm$ 0	0,3 $\pm$ 0,7	65,1 $\pm$ 4,3	
<b>96h</b>							
N	83 $\pm$ 127	13292 $\pm$ 309*	737 $\pm$ 503*	0 $\pm$ 0	35 $\pm$ 106	8430 $\pm$ 1910	22511 $\pm$ 444*
%	0,4 $\pm$ 0,6	58,9 $\pm$ 5,3*	3,3 $\pm$ 2,0	0 $\pm$ 0	0,2 $\pm$ 0,5	37,4 $\pm$ 4,3*	

Valores: média + DP (N=16) Os valores absolutos foram analisados pelo teste t de Student. Todos os outros parâmetros foram analisados pelo método U de Mann-Whitney. Em todos os casos, a diferença entre 0h e 96h foi considerada como estatisticamente significativa (\*) quando p < 0,05.

#### IV.3.6 Análise das Citocinas

Também para esta vacina não encontramos níveis detectáveis de IL-1 e TNF- como mencionado anteriormente.

Injetamos 50 L da vacina de Referência por via subcutânea na pata dos camundongos, e seguindo a cinética do edema induzido obtivemos o plasma dos animais nos períodos de 2, 6, 24, 48, 72 e 96 horas, e procedemos a quantificação das citocinas da mesma forma como foi realizado com a vacina DTP-1 e DTP-2.

Como a vacina DTP-1 e DTP-2, a vacina de Referência induziu um aumento nos níveis de IL-6, sobretudo nos intervalos de 2 horas e 6 horas. No entanto, para esta vacina não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes intervalos de tempo estudados.

No Gráfico 6 está representada a variação temporal da concentração da citocina IL-6 para a vacina de Referência.

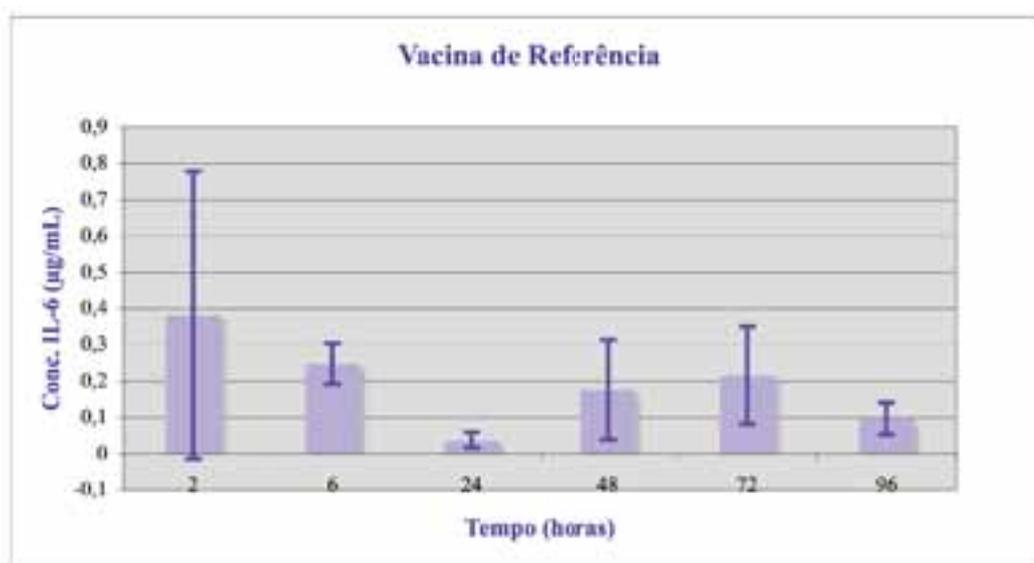


Gráfico 6. Dosagem da concentração de IL-6 por ELISA. Observa-se a concentração de IL-6 para os vários tempos nos quais foram feitas as medidas do edema. Os valores representam a média e o desvio padrão da leitura ótica realizada de cinco animais.

O tempo 0 (zero) não foi demonstrado no gráfico, porque os valores para esta citocina estavam abaixo do limite de detecção. As diferenças entre os valores observados nos diversos intervalos de tempo foram analisadas por ANOVA, seguido por teste t de Student. Não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os intervalos de tempo.

#### ***IV.4 Resultados referentes a vacina DT***

Seguindo o mesmo procedimento realizado com as vacinas DTP-1, DTP-2 e vacina de Referência, serão apresentados a seguir os resultados para a vacina DT (dupla).

##### ***IV.4.1 Ensaio clustering em células CHO***

A vacina DT não possui o componente pertussis, e desta maneira não é esperado resultado positivo para este ensaio. Sua utilização neste ensaio foi com o intuito de verificar se os componentes apresentados em sua formulação (*e.g.* hidróxido de alumínio) poderiam interferir com o resultado do efeito “clustering” em células CHO. Como os componentes da fórmula da vacina DTP e DT são os mesmos, (diferindo apenas no componente pertussis que a vacina DT não apresenta), isto significa que o ensaio não sofre interferência de outros componentes, que não seja o componente pertussis, como pode ser observado pelo resultado demonstrado na Tabela 13, onde a vacina DT, não produziu nenhuma reação.

**Tabela 13**  
**Relação entre a ocorrência do efeito clustering e o conteúdo de Toxina Pertussis Ativa - DT**

	<b>Toxina Pertussi (128ng/mL)</b>	<b>Vacina DT</b>
<b>Efeito Clustering</b>	1/32	negativo
<b>Conteúdo de Toxina Pertussis</b>	4ng/mL	negativo

#### IV.4.2 Ensaio do *Limulus Amebocyte Lisate (LAL)* ou Ensaio de Endotoxina

Nas diluições utilizadas, que variaram de 1/10 a 1/640.000 com fatores de diluição diferenciados, fator 10 nas quatro primeiras diluições e fator 2 nas diluições seguintes, a presença da reação de gelificação foi caracterizada pelo uso do sinal (+), indicando reação positiva e a ausência da reação de gelificação foi caracterizada pelo sinal (-), indicando reação negativa.

Com a vacina DT, foi observada a reação de gelificação ou reação positiva (+) até a diluição 1/80.

Expressando este resultado de forma quantitativa em relação a uma endotoxina padrão ou de referência, podemos estimar que o conteúdo de endotoxina está compreendido no intervalo que correspondente aos valores: > 10 e < 12,5 UE/mL como demonstrado na Tabela 14 . Estes valores são cerca de 1000 vezes menores do que aquele observado para as vacinas DTP-1 e DTP-2.

**Tabela 14**  
**Relação entre a ocorrência do efeito gel clot e o conteúdo de Endotoxina**

<b>Endotoxina de Referência</b>		<b>Vacina DT</b>
<b>α=0,125</b>		
<b>Efeito</b>		1/80 (+)
<b>Gel clot</b>		1/100 (-)
<b>Conteúdo de Endotoxina</b>	0,125UE/mL	> 10 UE/mL < 12.5 UE/mL

#### IV.4.3 Edema de Pata

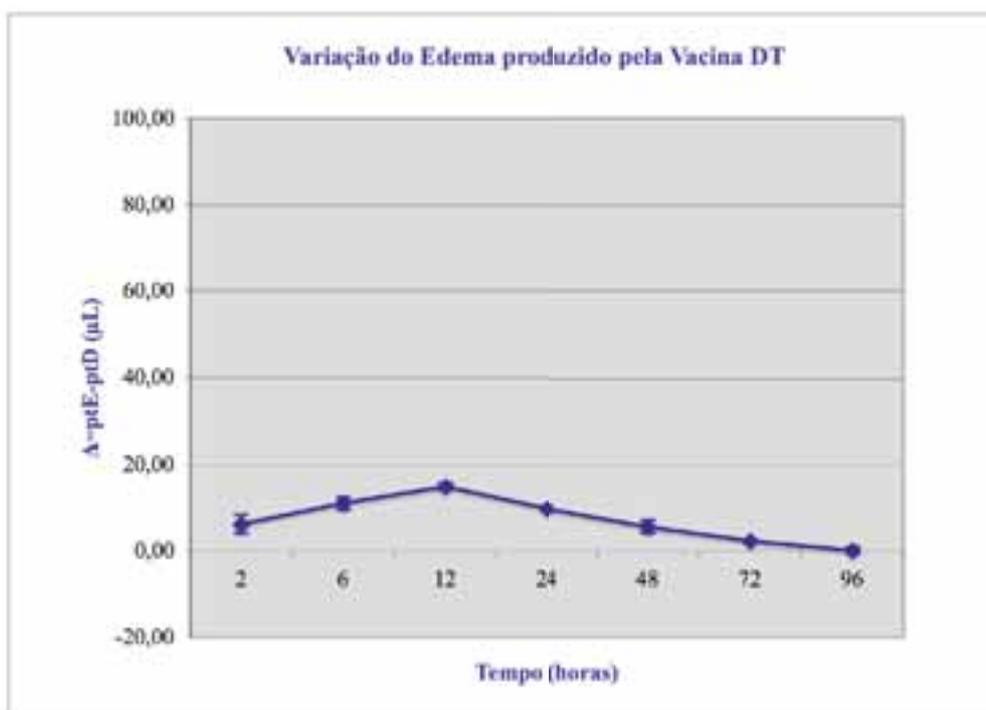
Os resultados da medida do edema de pata, como realizado para as vacinas DT-1, DTP-2 e Referência, foram expressos como a diferença (ou delta [  $\Delta$  ]) entre a pata esquerda e a pata direita, ver Tabela 15.

Tabela 15

Vacina Dupla - Valores Médios da Medida do Edema de Pata							
	2h	6h	12h	24h	48h	72h	96h
	N=18	N=18	N=18	N=18	N=18	N=18	N=18
$\Delta$ (ptE-ptD) $\mu$ L							
<b>Média</b>	6,25	11 <sup>a</sup>	15 <sup>a,b</sup>	10 <sup>a,c</sup>	6 <sup>b,c,d</sup>	2 <sup>a,b,c,d,e</sup>	0,13 <sup>a,b,c,d,e,f</sup>
<b>Desvio</b>	$\pm$ 2,121	$\pm$ 1,414	$\pm$ 0,707	$\pm$ 0,707	$\pm$ 1,414	$\pm$ 0	$\pm$ 0,707

Valores analisados pelo método de Kruskal-Wallis seguido pelo método U de Mann-Whitney. Diferenças significativas entre os valores de edema observados nos intervalos de tempo (p < 0,05) são designadas como segue: a 2h; b 6h; c 12h; d 24h; e 48h e f 72h. ptE – ptD = diferença entre a pata esquerda e a pata direita.

O objetivo desta medida foi verificar a cinética do edema produzido em relação ao tempo como apresentado no Gráfico 7. Os valores do edema apresentados por esta vacina foram bem menores do que aqueles apresentados pelas vacinas DTP-1, DTP-2 e Referência. Como na vacina de Referência não houve declínio da curva de edema às 12 horas.



O Gráfico 7 apresenta a variação do edema produzido pela Vacina de DT. O (delta) representa os valores médios do edema e desvios relacionados a diferença entre a pata esquerda que foi inoculada e a pata direita não inoculada.

#### IV.4.4 Análise Histopatológica

Da mesma forma como se procedeu para as vacinas DTP-1 e DTP-2 e Referência, na análise histopatológica das patas controles da vacina DT em microscópio não se observou alterações nos diferentes planos do tecido epitelial bem como na camada muscular nos diferentes períodos em que foram sacrificados os animais. Figura 10, A e B, item IV.1.4.

No intervalo de 2 horas, a análise histopatológica não revelou alterações na derme bem como na camada muscular. Figura 24.

No intervalo de 6 horas, a análise histopatológica revelou edema e discreto infiltrado de PMN na derme.

No intervalo de 12 horas, a análise histopatológica revelou em nível de derme discreto infiltrado de PMN e edema. Na camada muscular observou-se infiltrado de PMN e necrose de fibras musculares. Figura 25.

No intervalo de 24 horas, a análise histopatológica revelou em nível de camada muscular infiltrado de PMN e MN, exsudato purulento e necrose de fibras musculares. Na derme percebe-se discreto infiltrado de PMN e MN. Figura 26.

No intervalo de 48 horas, a análise histopatológica revelou infiltrado inflamatório com predominância de células mononucleadas na derme. Na camada muscular observou-se infiltrado de PMN e MN, progressão de exsudato purulento e necrose de fibras musculares. Figura 27.

No intervalo de 72 horas, os achados histológicos assemelham-se aos observados no período de 48 horas.

No intervalo de 96 horas, a análise histopatológica revelou em nível de derme a presença de rara células mononucleadas. Em nível de camada muscular observou-se expressivo infiltrado de células mononucleadas, exsudato purulento e necrose de fibras musculares. Figura 28.

## Histologia da reação inflamatória produzida pela vacina DT

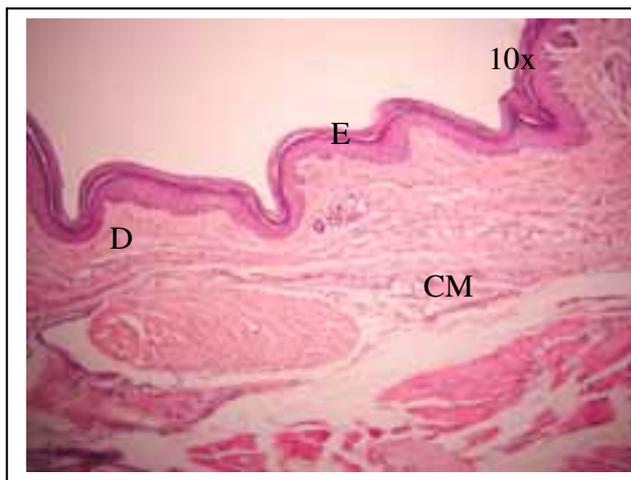


Figura 24. Pata Tratada. 2 horas. A análise histológica não revelou alterações na epiderme (E), derme (D) bem como na camada muscular (CM).

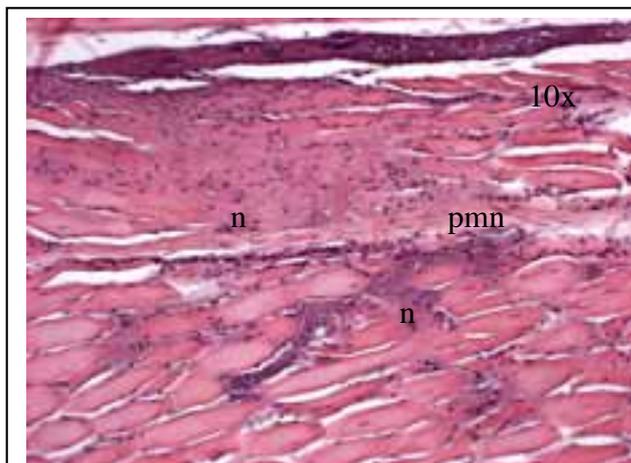


Figura 25. Pata Tratada 12 horas. A análise histológica revelou em nível na camada muscular infiltrado de polimorfonucleares (pmn) e necrose (n) de fibras musculares.

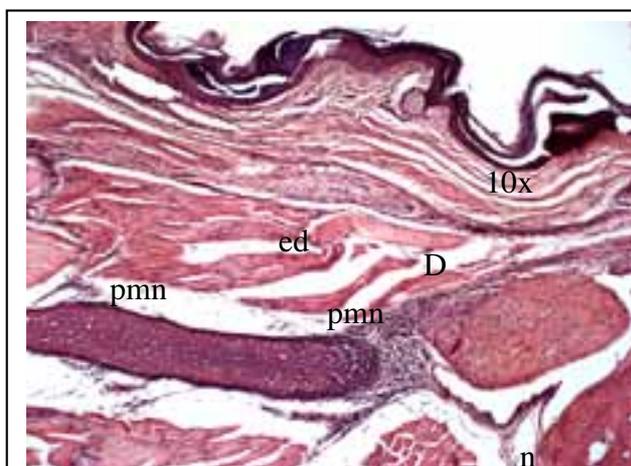
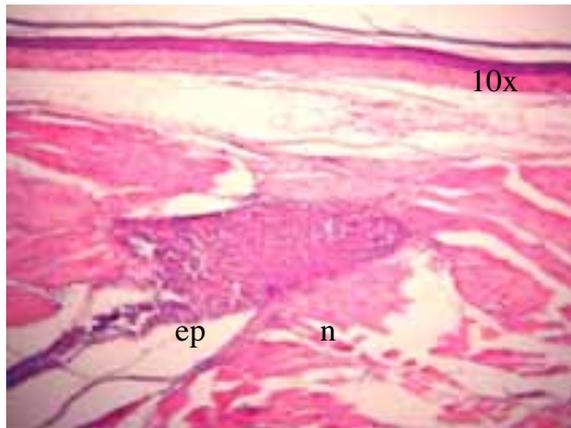
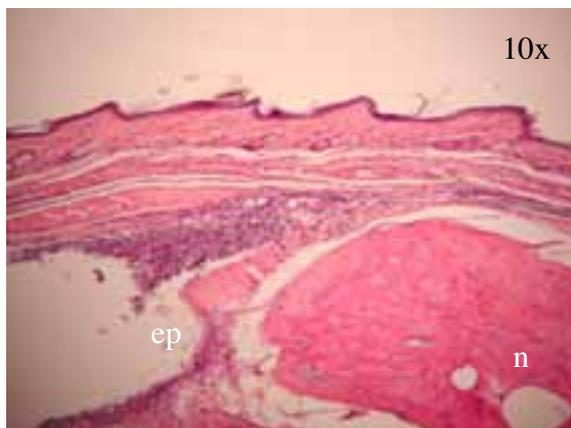


Figura 26. Pata Tratada 24 horas. A análise histológica revelou em nível de camada muscular infiltrado de polimorfonucleares (pmn), exsudato purulento e necrose de fibras musculares. Na derme percebe-se discreto infiltrado de polimorfonucleares (pmn).



*Figura 27. Pata Tratada 48 horas. A análise histológica revelou na camada muscular presença de exsudato purulento e necrose de fibras musculares.*



*Figura 28. Pata Tratada 96 horas. A análise histológica revelou em nível de camada muscular, exsudato purulento e necrose de fibras musculares.*

#### IV.4.5 Leucometria Total e Diferencial

Como esperado, diferentemente das vacinas DTP-1, DTP-2 e Referência, não se observou para a vacina DT variação na população celular de leucócitos, tanto nos valores absolutos como nos valores relativos (Tabela 16).

**Tabela 16**  
Análise dos Leucócitos antes e após o tratamento com a vacina DT

	Bastões	Neutrófilos	Monócitos	Basófilos	Eosinófilos	Linfócitos	Leucócitos
<b>0h</b>							
N	81±93	3534±532	300±115	0±0	58±91	7239±776	11212±957
%	0,7±0,8	31,5±3,8	2,7±1,0	0±0	0,6±0,9	64,6±4,0	
<b>96h</b>							
N	103±94	3763±591	293±122	0±0	45±64	6915±902	11119±1354
%	0,9±0,9	33,8±3,0	2,6±1,0	0±0	0,4±0,6	62,2±3,2	

Valores: média + DP (N=16) Os valores absolutos foram analisados pelo teste t de Student. Todos os outros parâmetros foram analisados pelo método U de Mann-Whitney. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre 0h e 96h.

#### IV.4.6 Análise das Citocinas

Não foram encontrados níveis detectáveis de citocinas para este produto.

#### **IV.5 Resultados referentes a vacina DTPa**

Da mesma maneira como procedemos para análise das vacinas anteriores, (DTP-1, DTP-2, vacina de Referência e vacina DT), apresentaremos a seguir os resultados da vacina DTPa (vacina DTP acelular).

##### IV.5.1 Ensaio clustering em células CHO

O resultado do conteúdo de Toxina Pertussis ativa na vacina DTPa foi expresso em relação ao resultado de uma preparação de referência (Toxina Pertussis NIBSC 90/518) com conteúdo de Toxina Pertussis de 128 ng/mL, como realizado para todas as outras vacinas.

Nas diluições seriadas com fator de diluição 2 com variação de 1/2 a 1/2048, observou-se que a vacina DTPa não induziu formação do efeito “clustering” (aglomeração celular) enquanto a Toxina de Referência induziu a formação do efeito “clustering” na diluição 1/32.

Como era esperado, a vacina DTPa apresentou resultado negativo como mostra a Tabela 17. O componente pertussis nesta vacina deve encontrar-se totalmente detoxificado, ou seja não apresentar toxicidade residual.

**Tabela 17**

<b>Relação entre a ocorrência do efeito clustering e o conteúdo de Toxina Pertussis Ativa - DTPa</b>		
	<b>Toxina Pertussis (128ng/mL)</b>	<b>Vacina DTPa</b>
<b>Efeito Clustering</b>	1/32	negativo
<b>Conteúdo de Toxina Pertussis</b>	4ng/mL	negativo

#### IV.5.2 Ensaio do *Limulus Amebocyte Lisate (LAL)* ou Ensaio de Endotoxina

Nas diluições utilizadas, que também variaram de 1/10 a 1/640.000 com fatores de diluição diferenciados, fator 10 nas quatro primeiras diluições e fator 2 nas diluições seguintes, a presença da reação de gelificação foi caracterizada pelo uso do sinal (+), indicando reação positiva e a ausência da reação de gelificação foi caracterizada pelo sinal (-), indicando reação negativa, como para todas as outras vacinas testadas.

Com a vacina DTPa, foi observada a reação de gelificação ou reação positiva (+) até a diluição 1/20.

Expressando este resultado de forma quantitativa em relação a uma endotoxina padrão ou de referência, podemos estimar que o conteúdo de endotoxina está compreendido no intervalo que correspondente aos valores: > 2,5 UE/mL e < 5 UE/mL como demonstrado na Tabela 18.

**Tabela 18**  
**Relação entre a ocorrência do efeito gel clot e o conteúdo de Endotoxina - DTPa**

<b>Endotoxina de Referência</b>		<b>Vacina DTPa</b>
<b>(i=0,125</b>		
<b>Efeito</b>		
<b>Gel clot</b>		1/20 (+)
		1/40 (-)
<b>Conteúdo de Endotoxina</b>	0,125 UE/mL	> 2.5 UE/mL
		< 5 UE/mL

### IV.5.3 Edema de Pata

O resultado da medida do edema de pata para a vacina DTPa, como nas outras vacinas, foi expresso como a diferença (ou delta [  $\Delta$  ]) entre a pata esquerda e a pata direita, como demonstrado na Tabela 19 .

**Tabela 19**

Vacina DT - Valores Médios da Medida do Edema de Pata							
	2h	6h	12h	24h	48h	72h	96h
	N=18						
$\Delta$ ptE - ptD / $\mu$ L							
<b>Média</b>	7	17a	11a,b	21a,b,c	16a,b,c,d	9a,b,c,d,e	5a,b,c,d,e,f
<b>Desvio</b>	$\pm 2,121$	$\pm 2,121$	$\pm 2,828$	$\pm 4,949$	$\pm 2,828$	$\pm 4,949$	$\pm 3,535$

Valores analisados pelo método de Kruskal-Wallis seguido pelo método U de Mann-Whitney. Diferenças significativas entre os valores de edema observados nos intervalos de tempo (p 0,05) são designadas como segue: a 2h; b 6h; c 12h; d 24h; e 48h e f 72h.  $\Delta$  ptE – ptD = diferença entre a pata esquerda e a pata direita.

O objetivo desta medida foi verificar a cinética do edema produzido em relação ao tempo como apresentado no Gráfico 8.



O Gráfico 8 apresenta a variação do edema produzido pela vacina DT. O  $\Delta$  (delta) representa os valores médios do edema e desvios relacionados a diferença entre a pata esquerda que foi inoculada e a pata direita não inoculada.

O perfil da cinética do edema apresentado por esta vacina foi bem diferente daqueles apresentados pelas vacinas DTP-1, DTP-2 e Referência, sendo mais próximo (em termos de volume de edema) ao perfil apresentado pela vacina DT.

Também observa-se que as 12 horas, a vacina DTPa produziu um declíneo na curva da medida do edema, como observado para as vacinas DTP-1 e DTP-2.

#### IV.5.4 Análise Histopatológica

Da mesma forma como se procedeu para as vacinas DTP-1 e DTP-2, Referência e vacina DT na análise histopatológica das patas controles da vacina DTPa em microscópio não se observou alterações nos diferentes planos do tecido epitelial bem como na camada muscular nos diferentes períodos em que foram sacrificados os animais. Figura 10, A e B, item IV.1.4.

No intervalo de 2 horas, a análise histopatológica revelou a presença de discreta reação inflamatória caracterizada por discreto infiltrado de PMN na derme. Figura 29, A e B.

No intervalo de 6 horas, a análise histopatológica revelou a presença de discreto infiltrado de PMN na derme.

No intervalo de 24 horas, a análise histopatológica revelou infiltrado de PMN na derme. Na camada muscular notou-se raras células mononucleadas, infiltrado de PMN e a presença de exsudato purulento. Figura 30.

No intervalo de 48 horas, a análise histopatológica revelou ser semelhante ao observado na leitura de 24 horas, porém com expressivo aumento do infiltrado de células mononucleadas. Figura 31, A e B.

No intervalo de 72 horas, a análise histopatológica revelou a presença de discreto infiltrado de PMN na derme. Na camada muscular observou-se expressivo infiltrado de PMN e MN e a presença de exsudato purulento. Figura 32, A e B.

No intervalo de 96 horas, a análise histopatológica revelou ser semelhante a observada no período de 72 horas. Figura 33, A e B.

## Histologia da reação inflamatória produzida pela vacina DTPa

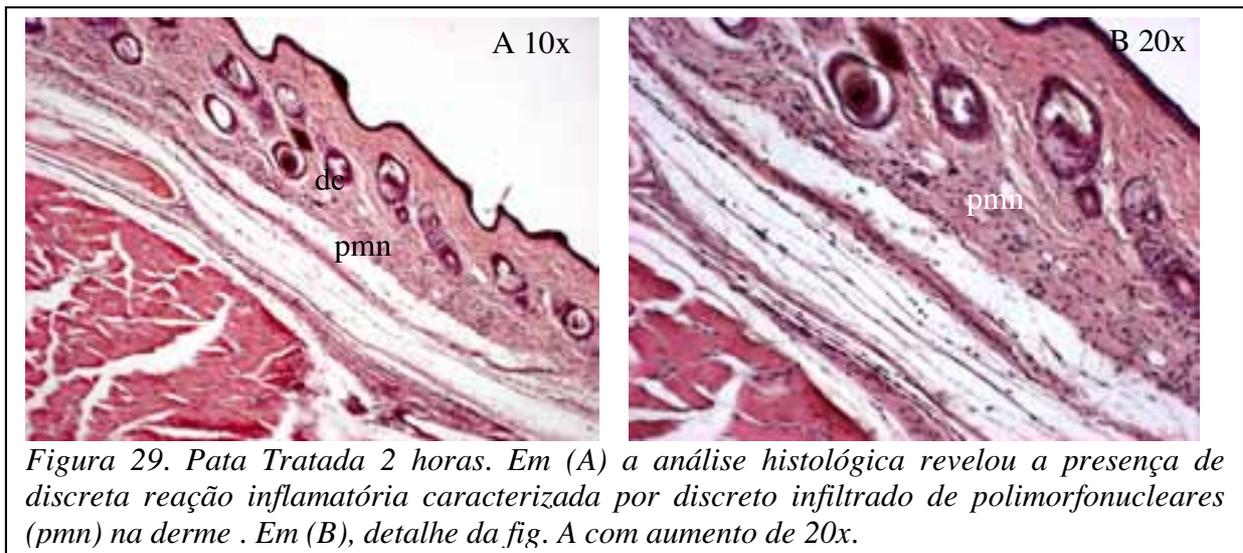


Figura 29. Pata Tratada 2 horas. Em (A) a análise histológica revelou a presença de discreta reação inflamatória caracterizada por discreto infiltrado de polimorfonucleares (pmn) na derme . Em (B), detalhe da fig. A com aumento de 20x.

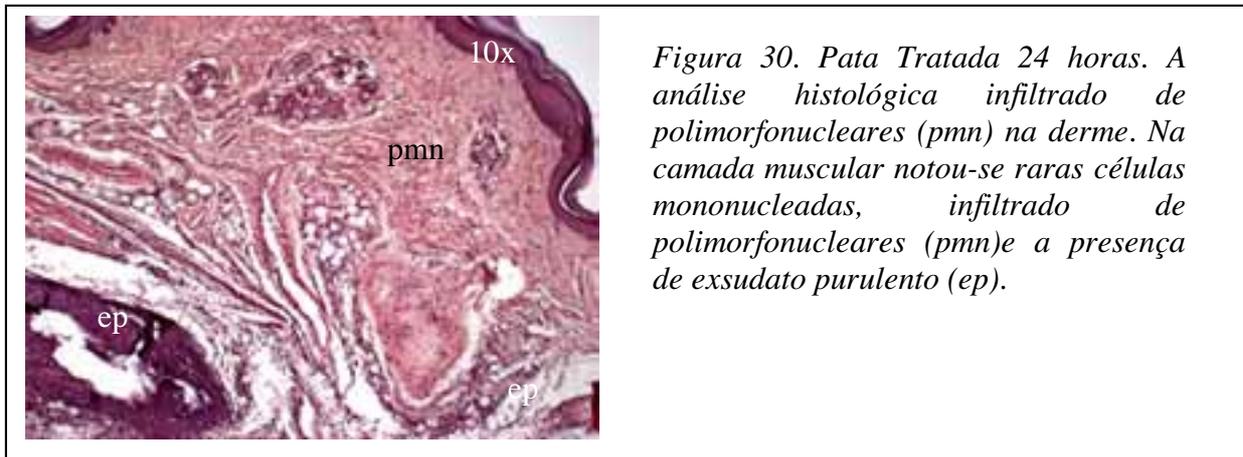


Figura 30. Pata Tratada 24 horas. A análise histológica infiltrado de polimorfonucleares (pmn) na derme. Na camada muscular notou-se raras células mononucleadas, infiltrado de polimorfonucleares (pmn) e a presença de exsudato purulento (ep).

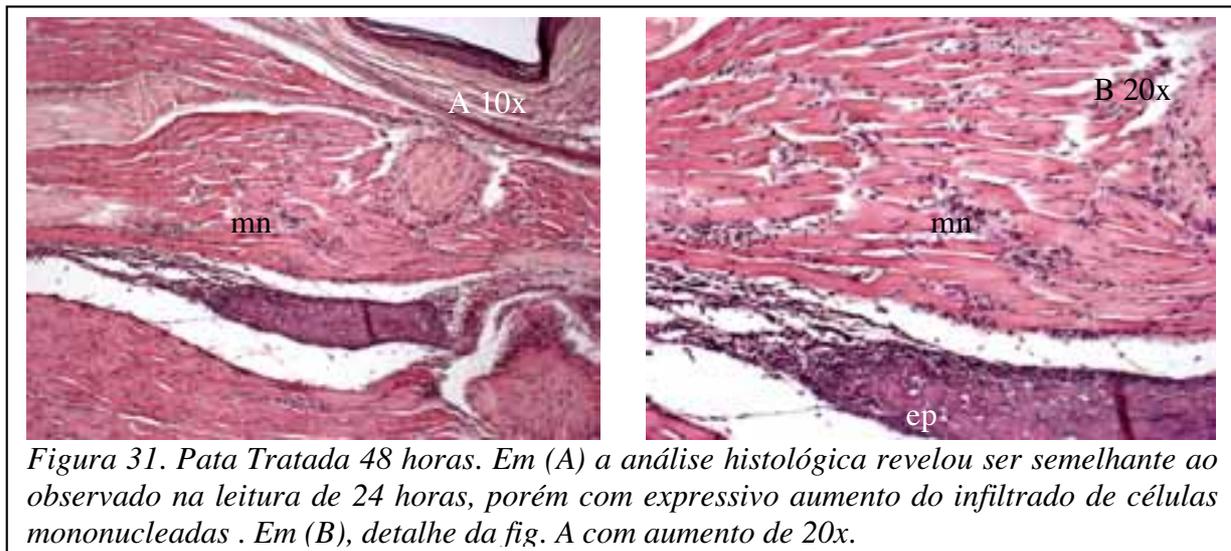


Figura 31. Pata Tratada 48 horas. Em (A) a análise histológica revelou ser semelhante ao observado na leitura de 24 horas, porém com expressivo aumento do infiltrado de células mononucleadas . Em (B), detalhe da fig. A com aumento de 20x.

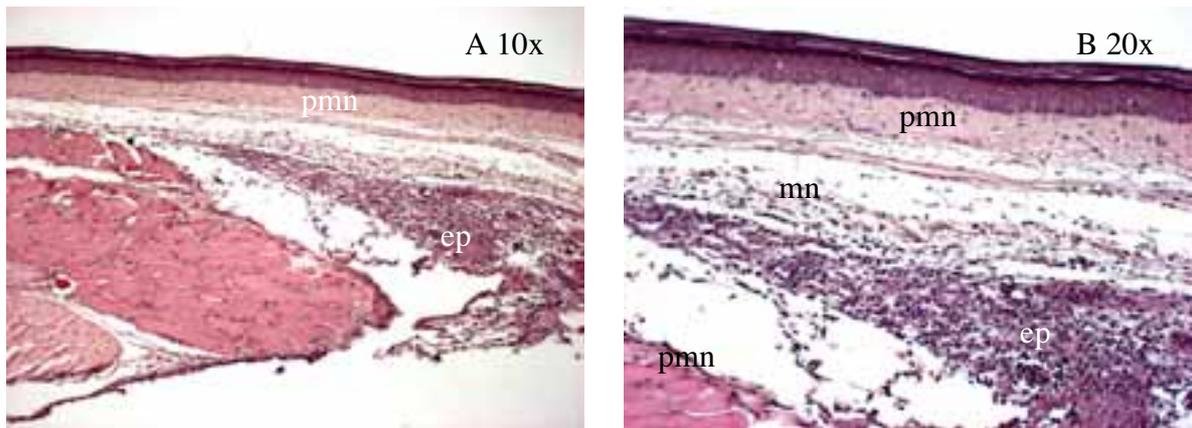


Figura 32. Pata Tratada 72 horas. Em (A) a análise histológica revelou a presença de discreto infiltrado de PMN na derme. Na camada muscular observou-se expressivo infiltrado de PMN e MN e a presença de exsudato purulento. Em (B), detalhe da fig. A, com aumento de 20x.

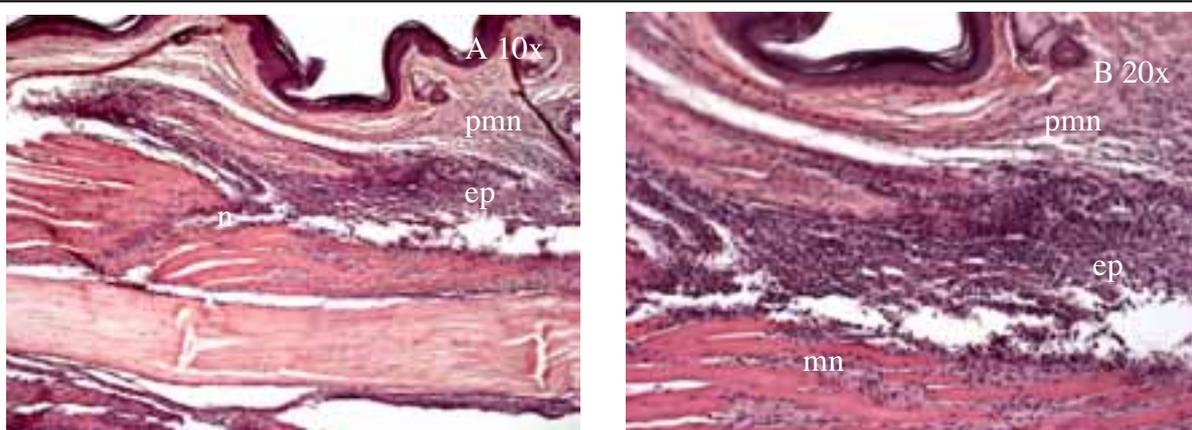


Figura 33. Pata Tratada 96 horas. Em (A) a análise histológica revelou ser semelhante a observada no período de 72 horas. Em (B), com detalhe da fig. A aumento de 20x.

#### IV.5.5 Leucometria Total e Diferencial

Assim como para a vacina DT, e diferentemente das vacinas DTP-1, DTP-2 e Referência, não se observou para a vacina DTPa variação na população celular de leucócitos, tanto nos valores absolutos como nos valores relativos. Este resultado já era até certo ponto esperado, já que esta vacina não deve possuir resíduos ativos de toxina pertussis (responsável pelo aumento de leucócitos) ou mesmo conteúdo elevado de LPS (incado como responsável pelo aumento de neutrófilos).

**Tabela 20**  
**Análise dos Leucócitos antes e após o tratamento com a vacina DTPa**

	<b>Bastões</b>	<b>Neutrófilos</b>	<b>Monócitos</b>	<b>Basófilos</b>	<b>Eosinófilos</b>	<b>Linfócitos</b>	<b>Leucócitos</b>
<b>0h</b>							
<b>N</b>	54±88	3677±373	258±91	0±0	18±43	7144±1127	11150±1263
<b>%</b>	0,5±0,8	33,2±3,5	2,3±0,8	0±0	0,2±0,4	63,8±3,8	
<b>96h</b>							
<b>N</b>	18±45	3641±580	304±116	0±0	72±57	6765±821	10800±1330
<b>%</b>	0,2±0,4	33,7±2,7	2,8±1,2	0±0	0,7±0,5	62,7±2,3	

Valores: média ± DP (N=6) Os valores absolutos foram analisados pelo teste t de Student. Todos os outros parâmetros foram analisados pelo método U de Mann-Whitney. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre 0h e 96h.

#### IV.5.6 Análise das Citocinas

Não foram encontrados níveis detectáveis de citocinas para este produto.

## **V. DISCUSSÃO**

Como foi mencionado anteriormente, o ensaio *in vivo* conhecido como ganho de peso em camundongos pode demonstrar a ação de alguns constituintes da vacina DTP relacionados ao componente pertussis: 1. conteúdo de LPS – através da perda de peso dos animais nas primeiras horas após a administração da vacina; 2. conteúdo de PT – através de morte dos animais durante o decorrer do ensaio e 3. conteúdo de HTL - através de morte dos animais nas primeiras horas do ensaio. Os ensaios conhecidos como *in vitro* quantificam a presença de PT e LPS; não estando estes ensaios, de forma alguma, associados à possibilidade de garantir a não ocorrência de efeitos adversos em campo, de maneira que não existe para esta vacina um ensaio preditivo.

Vimos também que a vacina induz efeitos sobre populações celulares, especificamente sobre os leucócitos, produzindo discreta linfocitose e neutrofilia e que reações de hipersensibilidade, que ocorrem pela via alternativa do complemento, estão relacionadas ao conteúdo dos antígenos da vacina DTP e que estes possuem características pró-inflamatórias. Podemos deduzir que esta gama de efeitos produzidos pela vacina DTP representa a ação de mediadores celulares e químicos que são desencadeados pela aplicação da vacina. Esta atividade não pode ser desvinculada da vacina DTP clássica (ou de células inteiras). Ela é inerente ao produto e está relacionada aos eventos ou reações locais e sistêmicas.

A reação na qual estão envolvidos estes mediadores, se traduzem, pelo menos em tese, pelos seguintes aspectos:

**indução local**

**dinamica das populações de leucócitos**

**citocinas**

**reação inflamatória**

Esta é a proposta investigativa de nosso trabalho. Desta forma com os cinco produtos biológicos, quatro comerciais (vacinas DTP1, DTP2, DTPa e DT) e um produto de Referência (a vacina de Referência Lot 11 NIH/FDA, utilizada em ensaio biológico de potência), foram aplicadas metodologias que podem fornecer resultados relacionados ao conteúdo de constituintes específicos das vacinas que contêm o componente pertussis (PT e LPS) e ainda investigada a resposta induzida por estes produtos em modelo animal, como demonstra a tabela abaixo:

Tabela 21  
Relação: "Ensaio, Resposta, Produto"

Ensaio	Resposta	Produtos Estudados
CHO	PT Ativa	DTP/DTPa/Vac Referência/DT*
LAL	LPS	DTP/DTPa/Vac. Referência/DT*
Medida do Edema	Reação Inflamatória Local	DTP/DTPa/Vac. Referência/DT
Histopatologia	Envolvimento Tecidual	DTP/DTPa/Vac .Referência/DT
Leucometria	Resposta Sistêmica	DTP/DTPa/Vac. Referência/DT
ELISA	Dosagem de Citocinas	DTP/DTPa/Vac. Referência/DT

\* O ensaios LAL e CHO não são preconizados para esta vacina

Na análise propriamente dos resultados obtidos, observamos que:

### ***V.1 Conteúdo de PT ativa***

Com relação ao conteúdo de PT ativa os três produtos relacionados abaixo apresentaram respostas bastante variáveis para este componente:

DTP 1 –	240 ng/mL
DTP 2 –	2.560 ng/mL
Ref –	3.200 ng/mL
DTPa –	Ausente (-)

Considerando que o valor máximo aceito pelo NBSC é de até 1.000 ng/mL, as vacinas DTP 2 e Referência apresentam-se notoriamente acima deste limite. A vacina DTPa apresentou resultado esperado.

### ***V.2 Conteúdo de LPS***

Apesar do LPS contido na vacina DTP ser responsável , pelo menos em parte, pelas reações adversas associadas a esta vacina, as agências regulatórias internacionais

não foram ainda capazes de estabelecer limites máximos aceitáveis desta endotoxina neste produto. Com relação ao conteúdo de LPS, os valores obtidos são considerados como característicos para as vacinas DTP 1, DTP2, DTPa e DT. No entanto, este valor foi extremamente elevado para a vacina de Referência.

O conteúdo de endotoxina apresentado pelas vacinas DTPa e DT provavelmente não causariam febre em coelhos no teste de pirogênio *in vivo* (limite: 5 UE/kg de peso corpóreo), já que a dose da vacina que corresponde a 0,5 mL encontram-se fora do limite de sensibilidade do teste *in vivo*.

DTP-1.....	10.000 UE/mL
DTP-2.....	10.000 UE/mL
Ref .....	160.000 UE/mL
DT.....	12,5 UE/mL
DTPa.....	5 UE/mL

### V.3 Medida do Edema

Os resultados apresentados com os produtos testados (DTP-1, DTP-2, Ref, DT e DTPa) demonstraram que é possível produzir uma reação inflamatória local acompanhada de edema de proporções variadas na pata de camundongos (gráfico 9), podendo esta reação ser medida em intervalos de tempo com razoável reprodutibilidade.

Gráfico 9

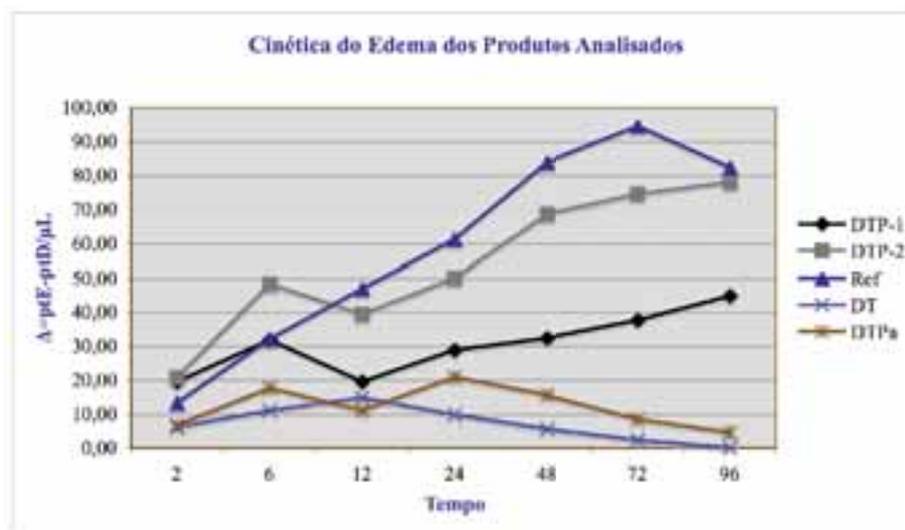


Gráfico 9. Mostra a curva da medida do edema dos cinco produtos testados.

Este tipo de reação local ainda tem sido descrita como severa e como um sério problema quando se aplicam várias doses como ocorre nos cronogramas de vacinação, tanto com a vacina DTP de células inteiras, quanto com as vacinas DTPa e DT.

A medida do edema, tomada em relação ao (delta), (diferença das patas esquerda e direita), demonstrou uma correlação com os valores de PT e LPS encontrados nos ensaios de CHO e LAL e o volume máximo do edema produzido.

Esta medida é uma função direta da resposta inflamatória induzida por estes produtos que são descritos como capazes de provocarem reações locais como endureção ou edema, eritema e dor. Tais reações estão ligadas principalmente ao conteúdo de PT ativa e LPS presentes na vacina DTP, devido a presença do componente pertussis. Assim, devemos esperar, que vacinas que não contenham o componente pertussis apresentem uma reação local diferenciada, como observado na resposta produzida pela vacina DT.

No entanto, nossos dados demonstram que todas as vacinas estudadas foram capazes de induzir o aparecimento do edema, na seguinte ordem de resposta (maior volume de edema para menor volume de edema):

Ref > DTP-2 > DTP-1 > DTPa > DT

Nas respostas apresentadas pelas vacinas DTP 1 DTP 2 e DTP a, verifica-se uma diminuição do edema e logo a seguir um aumento que ocorreu nas primeiras 12 horas do ensaio. Este decaimento poderia estar relacionado a capacidade de promoção de evasão das defesas do hospedeiro.

Também podemos inferir que o conteúdo de PT ativa deve ser o fator causal adjuvante que promove o aumento do edema na pata dos camundongos, como pode ser evidenciado pelo conteúdo de PT encontrado nas vacinas DTP 2 e Referência testadas (gráfico 9).

Numa análise comparativa entre as vacinas, podemos observar que aquelas vacinas que apresentaram menor conteúdo de LPS e ausência de toxina pertussis ativa (DT e a DTPa) são aquelas que produziram menor edema. Associando estes dados em relação ao conteúdo de PT e LPS teremos a seguinte correlação:

**Tabela 22**

<b>Comparação PT Ativa, LPS e Edema Máximo</b>			
Vacina	PT (ng/mL)	LPS (UE/mL)	Edema Máximo
Referência	3.200	160.000	94,61±0,707
DTP 2	2.560	10.000	78,06±2,121
DTP 1	240	10000	44,83±4,242
DT	-	12,5	14,94±0,707
DTPa	-	5	20,96±1,685

#### V.4 Análise Histopatológica

No estudo histopatológico, relacionamos o evento observado ao produto como mostra a tabela abaixo:

**Tabela 23**

		<b>Evento Histopatológico</b>									
		*ed	*pmn	*vc	*rmc	*ifl -CM	*e	*cmn	*ep	*n	*m
<b>Produtos (relação segundo conteúdo de LPS e PT)</b>	<b>Referência</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>DTP 2</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>DTP 1</b>	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
	<b>DT</b>	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-
	<b>DTPa</b>	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-

\* ed – edema (refere-se a observação histopatológica do acúmulo de líquido), pmn - polimorfonucleares, vc - vacuolização citoplasmática, rmc - ruptura de membrana celular, ifl-CM - infiltrado inflamatório na camada muscular, e – infiltrado pmn na epiderme (exocitose), cmn - células mononucleadas, ep - exsudato purulento, n – necrose, m – macrófagos.

O processo inflamatório ficou bem caracterizado em todos os produtos testados havendo eventos particulares produzidos pelas vacinas de Referência e DT, como vacuolização citoplasmática e necrose de fibras musculares respectivamente. Estes eventos não estão descritos na literatura e as prováveis causas ficam difíceis de serem apontadas.

Não foi evidenciada reação tecidual granulomatosa, descrita em alguns trabalhos como reação característica produzida pelo componente pertussis da vacina DTP.

### ***V.5. Leucometria***

Na análise leucométrica, o que ficou evidenciado em nosso estudo foi a capacidade das vacinas DTP 1, DTP 2 e Referência induzirem um aumento no número total de leucócitos, sem que tenha sido notado um aumento específico dos linfócitos.

A leucocitose associada à *B. pertussis* é uma característica que está bem documentada, e constitui-se de uma marcante linfocitose. Este aumento dos linfócitos, apesar de raramente acompanhar doenças agudas causadas por bactérias, foi excepcionalmente encontrado em muitos casos de coqueluche como relatado por Fröhlich em 1897.

Mais tarde este aspecto da doença foi confirmado por vários trabalhos e foi indicado como uma forma de diagnóstico da coqueluche. Segundo Morse 1965, este efeito também é produzido por células mortas de *B. pertussis*. Morse demonstrou ainda que a vacina DTP produzia um aumento do número de linfócitos em camundongos, a partir das primeiras 24 horas de inoculação com um máximo de resposta em 96 horas (4º dia da inoculação da vacina), com a população de leucócitos retornando ao seu valor normal ao redor do 14º dia pós-vacinação. Alguns estudos atribuíram esta linfocitose a toxina produzida pelo microorganismo, pois esta possui a capacidade de inibir a migração dos linfócitos para o tecido linfóide, resultando assim, em um acúmulo de pequenos linfócitos maduros no sangue periférico (Adler, 1973; Rai *et al.*, 1971). Alguns trabalhos indicam que a linfocitose é devida ao aumento dos linfócitos T e B (Bernales *et al.*, 1976; Bertotto *et al.*, 1984). Ainda na literatura sobre linfocitose induzida por *B. pertussis*, encontramos um artigo que sugere um aumento das células CD4+ e CD8+, enquanto outros estudos sugerem um aumento seletivo das células T CD4+ (Kubic *et al.*, 1991).

Em nosso trabalho, notamos um aumento tanto relativo como absoluto significativo dos neutrófilos. Uma explicação possível para este aumento poderia ser

dada pela sua associação com o decaimento dos níveis séricos da L-selectina (CD62L), receptor presente na superfície da maioria dos leucócitos, incluindo neutrófilos e monócitos (Tedder *et al.*, 1990). Acredita-se que este fenômeno é dependente da clivagem da L-selectina originada pela ação da toxina pertussis sobre monócitos e neutrófilos. A toxina pertussis não age sozinha neste processo, citocinas específicas como a IL-6, que são produzidas como parte da fase aguda da resposta inflamatória, mostram-se capazes de induzir neutrofilia enquanto está reduzida a expressão da L-selectina sobre a circulação de neutrófilos (Suwa *et al.*, 2002). Vários estudos indicam ainda que a L-selectina é um mediador da ligação dos leucócitos ao endotélio, no sítio da injúria do tecido ou inflamação (Tedder *et al.*, 1995).

Outros trabalhos indicam que a linfocitose está associada a dois fatores determinantes, *i.e* o conteúdo de toxina pertussis na vacina e a via de inoculação. Em nosso estudo, foi aplicada uma dose correspondente a 50 µL da vacina, ou seja, 10 vezes menor do que uma dose humana, que corresponde a 500 µL, por via subcutânea na pata do camundongo, o que parece não ser suficiente para ativar a linfocitose.

Por fim, vale ressaltar que, possivelmente, não foi somente o conteúdo de PT o responsável por este evento, já que o conteúdo de LPS também induz uma leucocitose com acentuada neutrofilia.

## ***V.6 Produção de Citocinas***

As citocinas que foram objetos de nosso estudo (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) estão diretamente envolvidas na resposta inflamatória aguda. Em conjunto, estas três citocinas apresentam envolvimento nas seguintes respostas biológicas:

- Febre
- Anorexia
- Leucocitose com desvio à esquerda
- Ativação de Macrófagos
- Hipoferremia, hipozincemia
- Síntese de Proteínas de fase aguda: Proteína C Reativa, Fibrinogênio, etc.
- Diminuição da síntese de Albumina, Transtiretina, Transferrina, etc.
- Ativação de linfócitos T e suas conseqüências
- Imunidade celular comprometida
- Modificações no metabolismo intermediário
- Hiperglicemia

- Proteólise e neoglicogênese: Balanço nitrogenado negativo
- Liberação de Hormônios: Glucagon, GH, Corticóides
- Secreção de Insulina (e/ou com resistência periférica à mesma)

O conteúdo de IL-1 e TNF- $\alpha$ , para todos os produtos testados, ficou muito próximos do limite de detecção do kit utilizado neste estudo. O software de leitura e cálculos utilizado (SoftMax Pro v.4.0) apresentou o conteúdo destas citocinas com desvios altos, sendo os resultados colocados como “outliers”.

Em nosso modelo de ensaio somente foi detectada a citocina IL-6 para os produtos DTP 1, DTP 2 e Vacina de Referência não sendo a mesma detectada para as vacinas DT e DTPa. Esta citocina, é característica de respostas à infecções bacterianas agudas. A expressão desta citocina também pode ter sido a causa da neutrofilia encontrada em nosso ensaio (vide item V.5).

Outro aspecto importante é que todas as vacinas estudadas induzem uma resposta de memória para o conteúdo de antígenos que possuem, como está bem demonstrado na literatura. Assim, a resposta induzida pela vacina DT e DTPa, possivelmente é do tipo Th2, já que as células do tipo B são mais eficientes na apresentação de antígenos pequenos ou solúveis estimulando este tipo de resposta (Th2).

Já para as vacinas DTP 1, DTP2 e Vacina de Referência é provável que a forma de apresentação do antígeno esteja associada a células fagocíticas como os macrófagos, que preferentemente apresentam antígenos de grande tamanho e estão associados a uma indução de resposta Th1, podendo mesmo haver um tipo misto de resposta Th1/Th2 devido a presença dos antígenos tetânico e diftérico.

Desta forma, a detecção dos níveis de IL-6, de atividade pró-inflamatória, deve estar relacionada a necessidade de uma resposta inflamatória para a eliminação de patógenos intracelulares como a *B. pertussis*. Além disso, se sabe que os filamentos de hemaglutinina (FHA) têm um efeito inibitório sobre a citocina IL-12, que poderia redundar em contrapartida como um efeito estimulador sobre a produção da IL-6.

Para finalizar, é importante ressaltar que a fisiopatologia de muitos eventos ou reações adversas que ocorrem após a imunização de crianças com a vacina contra a coqueluche ainda não é bem compreendida. Sugere-se que alguns destes eventos ou reações sejam causados por componentes biologicamente ativos como a toxina pertussis e o lipopolissacarídeo presentes na vacina DTP.

## VI. CONCLUSÕES

A investigação da resposta inflamatória produzida em camundongos pelas vacinas DTP de dois diferentes produtores (DTP-1 e DTP-2) em um estudo comparativo com as vacinas DT, DTPa e uma vacina de Referência, nos permitiu concluir que:

quanto ao conteúdo de PT ativa, as vacinas de Referência e a vacina de um dos produtores (*i.e.* DTP-2) encontravam-se muito acima do limite máximo estabelecido pelo NIBISC (1000ng/ml),

a concentração de LPS apresentou-se dentro dos padrões esperados para as vacinas DTPa e DT, em limites que provavelmente não causariam febre em coelhos no teste de pirogênio *in vivo*, conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira. As vacinas DTP-1 e DTP-2 apresentaram valores de endotoxina bem mais elevados, porém 16 vezes menores que o valor observado para a vacina de Referência.

todas as vacinas apresentaram a capacidade de induzir uma reação local, medida através do edema de pata, embora em intensidades diferentes de acordo com o produto em questão. As vacinas que apresentam o componente petussis, com exceção da vacina DTPa foram as que apresentaram maior intensidade de edema.

A análise histopatológica evidenciou eventos considerados comuns para todas as vacinas testadas como infiltrado de PMN, surgimento de células mononucleadas e a presença de exsudato purulento. Um evento que consideramos incomum foi a necrose de fibras musculares, que ocorreu para as vacinas DTP-1, DTP-2, Ref e DT. Consideramos como restrito um evento que ocorreu com a vacina DTP-2 e a vacina de Referência, a vacuolização citoplasmática de células do estrato espinhoso.

não foram detectados IL-1 e TNF como resposta para nenhum dos produtos que fizeram parte deste estudo. A IL-6, associada a infecções bacterianas, foi detectada após a vacinação com DTP-1, DTP-2 e Ref, principalmente nos intervalos de até 6 horas.

A análise de nossos resultados e o confronto destes com os dados da literatura nos permitem ainda concluir que:

- As substâncias que estão presentes nas vacinas testadas são capazes de promover uma reação inflamatória aguda local na pata dos camundongos. A mesma reação ocorre em humanos portanto este tipo de reação deve ser investigado.

- Os mecanismos que envolvem as reações associadas a vacina DTP ainda são desconhecidos, mas sabe-se que o componente pertussis é um dos responsáveis por estas reações.
- Embora muitos autores tenham descrito acentuada linfocitose induzida pela vacina DTP, em nosso estudo não evidenciamos este efeito. Possivelmente as condições experimentais (*e.g.* dose e via de inoculação) são fatores que interferem com este evento e são responsáveis pela diferença entre nossos resultados e aqueles encontrados na literatura.
- Nossos dados estão em acordo com aqueles descritos na literatura que evidenciam que a endotoxina presente em microorganismos Gram negativos, tem participação nas reações febris, nas reações locais como dor, calor, vermelhidão e inchaço (edema), além de causar leucocitose com neutrofilia.
- A fisiopatologia das reações produzidas pela vacina pertussis parecem ser de origem multifatorial, e esta característica muito provavelmente é a causadora do declínio da curva do edema.
- Com estes resultados podemos fazer distinção, entre as vacinas testadas de maneira a agrupá-las em: vacinas que produzem reações de menor intensidade e vacinas que produzem reações de maior intensidade, mas não podemos estabelecer um critério de normalidade para este tipo de reação.
- Apesar de ter sido pouco utilizada, a medida do edema de pata provavelmente é uma metodologia que pode fornecer um “screening” da reatividade local mas não sabemos se seria um ensaio preditivo; que pudesse ajudar a prever a reatividade da vacina em campo.
- A quantificação dos conteúdos de PT ativa e LPS demonstrou que os mesmos podem ser variados o que nos leva a pensar que o estabelecimento de um limite ou intervalo mais estreito do conteúdo destas substâncias faz-se necessário.

## VII. REFERÊNCIAS

AMANO K.; FUKUSHI K. and WATANABE M. Biochemical and immunological comparison of lipopolysaccharides from *Bordetella* species. **J. Gen. Microbiol.** 136, p. 481-487, 1990.

ARICO B. and RAPPUOLI R. *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. **J. Bacteriol.** 6, 169, p. 2847-2853L.C. , 1987.

ASHWORTH L. et al. Antigens in whooping cough vaccine and antibody levels induced by vaccination of children. **Lancet** 2, p. 878-881, 1983.

BAJC O. T. S. Convulsions after Pertussis Vaccination, **Schweiz. Med. Wschr.** 110, 1965-71, p. 13, 1980

BALDO, B.A.; THOMAS, P.G.; CATHERINE L.N. and TAYLOR K.M. Passive paw anaphylaxis in the rat. **Allergy** 35, p. 399-44, 1980

BARKIN R.M.; SAMUELSON J. S. and GOTLIN L. P. DTP Reactions and Serologic Response with a Reduced Dose Schedule, **J. Pediatr.** 105, p. 189-94, 1984.

BARKIN R. M. and PICHICHERO M. E. Diphtheria-Pertussis-Tetanus Vaccine: Reactogenicity of Commercial Products, **Pediatrics** 63, p. 256-60, 1979.

BELLANTI J.A., FISHMAN H.J., WIENZEN R.L. Adverse reactions to vaccines. **Immunol. AllergyClin. N. Amer.** 7, p. 423-445, 1987.

BORDET J. and O. GENGOU, Le microbe de la coqueluche. **Ann. Inst. Pasteur** (Paris) 20, p. 731-741, 1906.

CARRADA B. T., GOMEZ O. J., MARTÍNEZ L. J., La Tosferina y la vacunación antitosferinosa. **Sal. Pub. Méx.** XXVI, p. 399-465, 1982.

CHABY, R. and CAROFF, M. in: Pathogenesis and Immunity in Pertussis (**Wardlaw, A.C. and Parton, R., Eds.**), p. 247-271, Wiley, New York, 1988.

CHASE A., Magic Shots: A Human and Scientific Account of the Long and Continuing Struggle to Eradicate Infectious Diseases by Vaccination (New York: **William and Morrow Co. Inc.**, 1982).

CDC -CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. [ON LINE] 12 de agosto de 2003. Disponível em : <[http:// www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)>

CAMERON J. Pertussis Vaccine: Mouse-Weight-Gain (Toxicity) Test. **Develop. Biol. Standard.** 34, p. 213-215, 1977.

CAMERON J. (1967): The Influence of Environment on Mouse Weight-Gain Test for Estimating the Toxicity of *Bordetella pertussis*. In: **Proc. 10º int. Congr. Permanent Sect. microbiol. Standard. Int. Ass. Mivrobiol. Soc., Prague: Progr. Immunobiol. Standard.** vol.3, p.319-323 (Karger, Busel/New York 1969).

COOKSON B.T., VANDAMME P., CARLSON L.C., LARSON A.M., SHEFFIELD J.V.L., KERSTERS K. and SPACH D.H., Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, *B. hinzii*. **J. Clin. Microbiol.** 32, p. 2569-2571, 1994.

COOKSON B.T., CHO H.L., HERWALDT L.A. and GOLDMAN W.E., Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. **Infect. Immun.** 57, p. 2223-2229, 1989.

COULTER L. H., FISHER L. B., A Shot in the Dark, ed. **Avery a member of Penguin Group** (USA) Inc. 1991.

CUNDELL D.R., KANTHAKUMAR K., TAYLOR G.W., GOLDMAN W.E., FLAK T., COLE P.J. and R. WILSON, Effect of tracheal cytotoxin from *Bordetella pertussis* on human neutrophil function in vitro. **Infect. Immun.** 62, p. 639-643, 1994.

CULLINANE, M.R. ALLEY, R.B. MARSHALL and B.W. MANKTELOW, *Bordetella parapertussis* from lambs. **NZ Vet. J.** 35, p. 175, 1987.

DAMME P. van, HEYNDRICKX M., VANCANNEYT M., HOSTE B., DEVOS P., FALSEN E., KERSTERS K. and HINZ K.H., *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1983. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 46, p. 849-858, 1996.

DAMME, P. VAN, HOMMEZ J., VANCANNEYT M., MONSIEURS M., HOSTE B., COOKSON B., WIRSING C.H., KONIG von, KERSTERS K. and BLACKALL P.J., *Bordetella hinzii* sp. nov., isolated from poultry and humans. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 45, p. 37-45, 1995.

DAVIS L. E., BURSTYN D. G., and MANCLARK C. R., Pertussis Encephalopathy with a Normal Brain Biopsy and Elevated Lymphocytosis-Promoting Factor Antibodies. **Pediatr. Infect. Dis.** 3, p. 448-51, 1984.

DIPHTERIA, TETANUS AND PERTUSSIS: GUIDELINES FOR VACCINE PROPHYLAXIS AND OTHER PREVENTIVE MEASURES. **Recommendation of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP)** 40(RR10), p. 1-28, August 8, 1991.

ELDERING, G. International Symposium on Pertussis. **FDA/NHI**, 1978.

EDWARDSE, K. M.; DECKER, M. D. & MORTIMER, E. A. Pertussis vaccine. In: Vaccines (S. A. Plotkin & W. A. Orenstein, ed.) 1999 p. 293-337, Philadelphia:W. B. Saunders.

FELTON, H.M. and C.Y. WILLARD. Current Status of prophylaxis by *Haemophilus pertussis* vaccine. **JAMA** 126, p. 294-299, 1944.

FERNANDEZ R.C. and WEISS A.A., Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. **Infect. Immun.** 62, p. 4727-4738, 1994.

FERNANDEZ R.C. and WEISS A.A., Serum resistance in bvg-regulated mutants of *Bordetella pertussis*. **FEMS Microbiol. Lett.** 163, p. 57-63, 1998.

- FINN T.M. and STEVENS L.A., Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. **Mol. Microbiol.** 16, p. 625-634, 1995.
- GARDNER R. A. and PITTMAN M., Relative Stability of Pertussis Vaccine Preserved with Methiolate, Benzethonium Chloride, or the Parabens, **Appl. Microbiol.** 4, p. 564-69, 1965.
- GEIER M. R., STANBORO H., and MERRIL C. R., Endotoxin in Commercial Vaccines, **Appl. Environ. Microbiol.** 36, p. 445-49, 1978.
- GOODNOW R.A., Biology of *Bordetella bronchiseptica*. **Microbiol. Rev.** 44, p. 722-738, 1980.
- GORDON V.M., YOUNG W.J., LECHLER S.M., GRAY M.C., LEPPLA S.H. and HEWLETT E.L., Adenylate cyclase toxins from *Bacillus anthracis* and *Bordetella pertussis*. Different processes for interaction with and entry into target cells. **J. Biol. Chem.** 264, p. 14792-14796, 1989.
- GROSS R., ARICO B. and RAPPUOLI R., Genetics of pertussis toxin. **Mol. Microbiol.** 3, p. 119-124, 1989.
- GROSS M.K., AU D.C., SMITH A.L. and STORM D.R., Targeted mutations that ablate either the adenylate cyclase or hemolysin function of the bifunctional *cyaA* toxin of *Bordetella pertussis* abolish virulence. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 89, p. 4898-4902, 1992.
- GUTIÉRREZ A.L., GÓMEZ J.L.V, AMOR J.S. In: **Vacunas, Ciencia e Salud**, p.29-53, México, 1992..
- HEISS L.N., MOSER S.A., UNANUE E.R. and GOLDMAN W.E., Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of pertussis. **Infect. Immun.** 61, p. 3123-3128, 1993.
- HEISS L.N., LANCASTER J.J., CORBETT J.A. and GOLDMAN W.E., Epithelial autotoxicity of nitric oxide: role in the respiratory cytopathology of pertussis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91, p. 267-270, 1994.
- HEVEKER N. and LADANT D., Characterisation of mutant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxins with reduced affinity for calmodulin. **Eur. J. Biochem.** 243, p. 643-649, 1997.
- HEWLETT, E. L., SAUER, K.T., MYERS, G. A., Cowell, J. L. & Guerrant, R. L. Induction of a novel morphological response in chinese hamster ovary cells by pertussis toxin. **Infect. Immun.** 40 (3), p. 1198-1203, 1983.
- HYNES R.O., Integrins: versatility, modulation, and signalling. **Cell** 69, p. 11-25, 1992.
- LESLIE, P.H. and A.D. GARDNER. The phases of *Haemophilus pertussis*. **J. Hyg. (Camb.)** 31, p. 423-434, 1931.

- LUKER K.E., TYLER A.N., MARSHALL G.R. and GOLDMAN W.E., Tracheal cytotoxin structural requirements for respiratory epithelial damage in pertussis. **Mol. Microbiol.** 16, p. 733-743, 1995.
- KENDRICK P. and G. ELDERING, Progress Report on Pertussis Immunization. **Am. J. Public Health**, 26, p. 8-12, 1936.
- KERSTERS K., K., HINZ H., HERTLE A., P. SEGERS, A. LIEVENS, O. SIEGMANN and J. De LEY, *Bordetella avium* sp. nov., isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 34, p. 56-70, 1984.
- IBSEN P., MOLLER S., and HERON I., Lipopolysaccharides in a Traditional Pertussis Vaccine, **J. Biol. Stand.** 16, p, 299-309, 1988.
- IIDA T. and OKONOGI T., Lethotoxicity of *Bordetella pertussis* in mice. **J. Med. Microbiol.** 4, p. 51-61, 1971.
- IVANOFF, B. & ROBERTSON, S. E., Pertussis Vaccine Trials. Pertussis: A worldwide problem. **Developments in Biological Standardization**, 89, p. 3-13, 1997.
- KATADA T., TAMURA M. and UI M., The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin, as an active peptide catalysing ADP-ribosylation of a membrane protein. **Arch. Biochem. Biophys.** 224, p. 290-298, 1983.
- KENDRICK P., ELDERING G., and BOROWSKI A. A., A Study of Active Immunization against Pertussis, **Am. J. Hyg.** 29, p. 133-39, 1939.
- KENDRICK P.L., G. ELDERING, M.K. DIXON and J. MISNER., Mouse protection test in the study of pertussis vaccine: a comparative series using the intracerebral route for challenge. **Am J. Publ. Health.** 37, p. 803-810, 1947.
- KHELEF N., SAKAMOTO H. and GUISSO N., Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. **Microb. Pathogen.** 12, p. 227-235, 1992.
- LARSON L., Report: Vaccine Might Trigger Reactions, **Am. Acad. Pediatr. News**, , 10, p. 116, April 1994.
- LEININGER E., ROBERTS M., KENIMER J.G., CHARLES I.G., FAIRWEATHER N., NOVOTNY P. and BRENNAN M.J., Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88, p. 345-349, 1991.
- LI L.J., DOUGAN G., NOVOTNY P. and CHARLES I.G., P.70 pertactin, an outer-membrane protein from *Bordetella parapertussis*: cloning, nucleotide sequence and surface expression in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 5, p. 409-417, 1991.
- LIVEY I. and WARDLAW A.C., Production and properties of *Bordetella pertussis* heat-labile toxin. **J. Med. Microbiol.** 17, p. 91-103, 1984.
- MADSEN T., Vaccination against Whooping-cough, **J. Am. Med. Assoc.**, 101, p. 187-88, 1933.

MAKOFF A.J., OXER M.D., BALLANTINE S.P., FAIRWEATHER N.F. and CHARLES I.G., Protective surface antigen P69 of Bordetella pertussis: its characterization and very high level expression in Escherichia coli. **BioTechnology** 8, p. 1030-1033, 1990.

MANCLARK, C.R. e J.L. COWELL. . Pertussis, p. 69-106. In: R. Germier, (ed), **Bacterial Vaccines**. Academic Press, Inc., New York, 1984.

MANUAL DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DOS EVENTOS ADVERSOS PÓS-VACINAÇÃO – Organizado pela Coordenação de Imunizações de Auto-Suficiência em Imunobiológicos – Brasília : **Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde**, 1998. 102p.

MEDICAL RESEARCH COUNCIL. Vaccination against whooping cough: relation between protection in children and results of laboratory tests. **Brit. Med. J.** 2, p. 454-462, 1956.

MEDICAL RESEARCH COUNCIL. Vaccination against whooping cough: Final report to whooping cough immunization committee. **Brit. Med. J.** 1, p. 994-1000, 1959.

MEDICAL RESEARCH COUNCIL, The Prevention of Whooping-cough by Vaccination. **Br. Med. J.** 2, p. 1464-72, 1951.

MONTARAZ J.A., NOVOTNY P. and IVANYI J., Identification of a 68-kilodalton protective protein antigen from Bordetella bronchiseptica. **Infect. Immun.** 47, p. 744-751, 1985.

MORENO V. S., DÍAZ H.R.H. Pertussis - Lima : **Ministerio de Salud, OGE, INS**, 2000.

MUNOZ JOHN J. Biological Activities of Pertussigen. In: Pertussis Toxin. Ed. **Academic Press**, 1985.

**NIBSC** (National Institute for Biological Standards and Control): *CHO Cell Assay Standard Operating Procedures*, Hertfordshire, United Kingdom, 1999a.

PARRISH H. J., A History of Immunization, **Edinburgh and London, E. and S. Livingstone**, pp. xi, 356, 50s, 1965.

PEPPLER M.S., Two physically and serologically distinct lipopolysaccharide profiles in strains of Bordetella pertussis and their phenotype variants. **Infect. Immun.** 43, p. 224-232, 1984.

PITTMAN M., “History, Benefits and Limitations of Pyrex Glass Particle Opacity References,” **J. Biol. Stand.**, 4, p. 115-25, 1976.

PITTMAN M., The Concept of Pertussis as a Toxin-mediated Disease, **Pediatr. Infect. Dis.** 3, p. 467-86, 1984.

PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PERTUSSIS, **NIH**, 21 October 1963.

RAMBOW A.A., FERNANDEZ R.C. and WEISS A.A., Characterization of brkA expression in *Bordetella bronchiseptica*. **Infect. Immun.** 66, p. 3978-3980, 1998.

Recommendation of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP) Diphtheria, Tetanus and Pertussis: Guidelines for Vaccine Prophylaxis and Other Preventive Measures. **MMWR.** 34(27), p. 405-14, 419-26, July 12, 1985.

ROGEL A. and HANSKI E., Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane. **J. Biol. Chem.** 267, p. 22599-22605, 1992.

SAUER L., Whooping-cough: A Study in Immunization, **J. Am. Med. Assoc.**, 101, p. 239-41, 1933.

SAUER L., Immunization with *Bacillus pertussis* Vaccine, **J. Am. Med. Assoc.**, 101, p.1449-51, 1933.

SCHMIDT G., GOEHRING U.M., SCHIRMER J., LERM M. and AKTORIES K., Identification of the C-terminal part of *Bordetella dermonecrotic* toxin as a transglutaminase for rho GTPases. **J. Biol. Chem.** 275, p. 31875-31881, 1999.

SILL E. M., The Vaccine Treatment of Whooping-cough, **Am. J. Dis. Child.** 5, p. 379-85, 1913.

STEVEN A.C., BISHOP M.E., TRUS B.L., THOMAS D., ZHANG J.M. and COWELL J.L., Helical structure of *Bordetella pertussis* fimbriae. **J. Bacteriol.** 167, p. 968-974, 1986.

STROM J., Is Universal Vaccination against Pertussis Always Justified? **Br. Med. J.** 2, 1184-86, p. 12-13, 1960.

SWITZER W.P., Studies on infectious atrophic rhinitis. V. Concept that several agents may cause turbinate atrophy. **Am. J. Vet. Res.** 17, p. 478-484, 1956.

THOMPSON H., MCCANDLISH I.A. and WRIGHT N.G., Experimental respiratory disease in dogs due to *Bordetella bronchiseptica*. **Res. Vet. Sci.** 20, p. 16-23, 1976.

TORCH W. C., Diphtheria-Pertussis-Tetanus (DPT) Immunization: A Potential Cause of the Sudden Infant Death Syndrome (SIDS), **Neurology** 32, A169 - A170, 1982.

TUOMANEN E., Piracy of adhesins: attachment of superinfecting pathogens to respiratory cilia by secreted adhesins of *Bordetella pertussis*. **Infect. Immun.** 54, p. 905-908, 1986.

TUOMANEN E. and WEISS A., Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory-epithelial cells. **J. Infect. Dis.** 152, p. 118-125, 1985.

VERONESI R, FOCACCIA R, editores. **Tratado de infectologia.** 4ª ed. São Paulo: Atheneu; 1999.

YAMAMOTO A., NAGATA N., OCHIAI M., KATAOKA M., TOYOIZUMI H., OKADA K., HORIUCHI Y. Enhanced sensitization of mice with diphtheria tetanus acellular pertussis vaccine to local swelling reaction to the booster immunisation. **Vaccine** 20, p. 3088-3094, 2002.

WARDLAW A. C. and R. PARTON, **Medical Microbiology** (London: Academic Press, 1983), p. 207-53.

WATANABE M., TAKIMOTO H., KUMAZAWA Y. and AMANO K., Biological properties of lipopolysaccharides from Bordetella species. **J. Gen. Microbiol.** 136, p. 489-493, 1990.

WEISS A.A. and GOODWIN M.S., Lethal infection by Bordetella pertussis mutants in the infant mouse model. **Infect. Immun.** 57, p. 3757-3764, 1989.

WELCH R.A., Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. **Mol. Microbiol.** 5, p. 521-528, 1991.

WEYANT R.S., HOLLIS D.G., WEAVER R.E., AMIN M.F.M., STEIGERWALT A.G., OCONNOR S.P., WHITNEY A.M., DANESHVAR M.I., MOSS C.W. and Brenner D.J., Bordetella holmesii sp. nov., a new Gram-negative species associated with septicemia. **J. Clin. Microbiol.** 33, p. 1-7, 1995.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 1990. Requirements for Diphtheria, Tetanus, Pertussis and Combined Vaccines. Fortieth Report of WHO Expert Committee on Biological Standardization, **WHO Technical Report Series 800**. Geneva:WHO

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 1985. Developments in pertussis vaccine. **Bull. World Health Organization.** 63: 241-248.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1993. The Immunological Basis for Immunization Series Module 4. Disponível em:  
<<http://www.who.ch/programmes/gpv/english/avail/gpvcatalog/catlog1.htm>>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1999) The World Health Report, 1999: Making a Difference. World Health Organization, Geneva. Disponível através do site de busca <[http://www.google.com/The World Health Report, 1999: Making a Difference/](http://www.google.com/The%20World%20Health%20Report,%201999:%20Making%20a%20Difference/)>.

ZEE, van der MOOI F., EMBDEN J. van and MUSSER J., Molecular evolution and host adaptation of Bordetella spp. - phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences. **J. Bacteriol.** 179, p. 6609-6617, 1997.

