

EFEITO ADJUVANTE DO CLORETO DE DIMETILDIOCTADECILAMÔNIO EM PREPARAÇÕES DE TOXÓIDE TETÂNICO*

(*Adjuvant effect of dimethyl dioctadecyl ammonium chloride in tetanic toxoid preparations*)

SILVA, L.C.¹; TAKIUCHI, E.¹; ALFIERI, A.F.²; ALFIERI, A.A.²

¹Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina;

²Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. Caixa Postal: 6001. Tel.: + 43-3371-4068; E-mail: alfieri@uel.br.

RESUMO – Foram formuladas duas vacinas contendo a mesma concentração de toxina, com o intuito de se avaliar a habilidade do adjuvante cloreto de demetiloctadecilamônio (DDA cloreto) em potencializar a resposta imune em cobaias imunizada com o toxóide tetânico. A vacina A foi adsorvida com hidróxido de alumínio e a vacina B compreendia a associação do hidróxido de alumínio e DDA cloreto. Os títulos de antitoxina no soro dos cobaios imunizados foram quantificados por soroneutralização em camundongos frente a uma dose contendo 1 Lp/10 (limite paralítico) de toxina tetânica. A inclusão do DDA cloreto em vacinas constituídas por toxóide tetânico adsorvido com hidróxido de alumínio promoveu maior ativação das respostas imunes humorais e celulares de cobaias, quando comparada à resposta imune dos animais que receberam o antígeno adsorvido apenas com o hidróxido de alumínio. Os animais recebedores da vacina B apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes 2,66 vezes maiores que os que receberam a vacina A, demonstrando a potencialização da resposta imune humoral promovida pelo DDA cloreto. A resposta imune celular, avaliada pela reação de hipersensibilidade cutânea tardia, foi 17,8 maior no grupo B. Esses resultados demonstram que o DDA cloreto é um potente ativador da resposta imune humorai e celular de cobaias imunizados com o toxóide tetânico.

Palavras chave: toxóide tetânico, cobaias, cloreto de dimetildioctadecilamônio, resposta imune.

ABSTRACT – Two vaccines were formulated with the same concentration of antigen and different adjuvants to assess the performance of dimethyl dioctadecyl ammonium chloride (DDA chloride) in boosting the immune response in guinea pigs immunized with tetanic toxoid. Vaccine A was adsorbed with aluminum hydroxide and vaccine B contained an association of aluminum hydroxide and DDA chloride. The antitoxin titres in the immunized guinea pig sera were assessed serum neutralization in mice using a toxin containing one Lp/10 dose (paralytic limit). The inclusion of DDA chloride in vaccines made up of tetanic toxoid adsorbed with aluminum hydroxide causes a greater activation of the humoral and cell immune response in guinea pigs when compared with the animals which received the antigen adsorbed only with aluminum hydroxide. The animals which received vaccine B had 2.66 times more neutralizing antibodies than those which received vaccine A, showing the boosting of the humoral immune response caused by DDA chloride. The animals from group B also had a strong immune cell response by the delayed type hypersensitivity reaction, which was 17.8 times higher than group A. These results show that DDA chloride is a potent activator of the humoral and cell immune response in guinea pigs immunized with tetanic toxoid.

Key words: tetanic toxoid, adjuvant, dimethyl dioctadecyl ammonium chloride, guinea pig, immune response.

Introdução

A infecção causada pelo *Clostridium tetani* representa ainda hoje risco para a saúde humana e animal. Apesar da baixa morbidade, a taxa de letalidade do tétano é alta e pode alcançar 50% em humanos (PREVOTS *et al.*, 1992; BRABEK *et al.*, 1999).

Em associação às condutas de caráter higiênico-sanitário, a vacinação contra o tétano é uma importante medida na profilaxia dessa toxinfecção (CATES, 1990 ; BONANNI, 1999).

Na elaboração da vacina antitetânica e para o incremento da imunogenicidade do toxóide tetânico e consequentemente da taxa de imunização, é necessária a inclusão de adjuvantes imunológicos. Um bom adjuvante pode aumentar a potência de toxóides comerciais em níveis superiores a 1000 vezes (UNGAR, 1966). Rotineiramente, o toxóide tetânico tem sido utilizado absorvido ao gel de hidróxido de alumínio ou precipitado pelo álumen de potássio (REYNOLDS, 1993). Diferentes tipos de adjuvantes têm sido testados em vacinas antitetânicas e os melhores resultados, são obtidos com formulações oleosas. Como inconveniente, essa classe de adjuvantes determina efeitos colaterais indesejáveis devido à reação inflamatória local. O ponto de inoculação pode tornar-se dolorido e, em algumas situações, podem ser formados abscessos assépticos (BRODERSON, 1989).

GALL (1966) demonstrou que bases nitrogenadas alifáticas, abrangendo o grupo das aminas quaternárias, exerciam uma efetiva atividade adjuvante tanto na resposta imune humoral quanto na celular. A maioria das aminas quaternárias lipofílicas testadas teve atividade adjuvante, sendo que o brometo de dimetildioctadecilamônio (DDA) foi o mais efetivo. Desde então, a capacidade do DDA em potencializar as respostas imunes humoral e/ou celular de animais e humanos vem sendo avaliada com antígenos de diferentes origens e complexidade vírus, bactérias, parasitas, toxinas, células de mamíferos, carreadores - haptenos (HILGERS e SNIPPE, 1992).

Em vacinas constituídas por toxóide tetânico o DDA foi inicialmente testado como adjuvante por GALL (1966), obtendo-se resultados

favoráveis na avaliação da soroconversão de cobaios. VERONESI *et al.* (1970) observaram aumento significativo do título de anticorpos em humanos vacinados com toxóide tetânico, em associação com o gel de hidróxido de alumínio e o DDA, não sendo detectados efeitos colaterais. Ainda em humanos, o DDA também foi utilizado como adjuvante em vacinas com toxóide tetânico para a imunização neonatal, com resultados também satisfatórios (STANFIELD *et al.*, 1973).

Esse trabalho teve como objetivo avaliar, por meio de ensaios biológicos realizados em animais de laboratório, a imunogenicidade de preparações de toxóide tetânico tendo como adjuvantes o hidróxido de alumínio e a associação do hidróxido de alumínio com o DDA cloreto.

Material e Métodos

A toxina tetânica foi produzida a partir da cépa referência do *Clostridium tetani*, amostra Harward (ATCC 10779), cultivada segundo protocolo descrito por HEMMERT (1971). Após a reconstituição da amostra liofilizada, foram efetuados quatro repiques em meio tioglicolato fluído mantido a 37° C por 12 a 24h em condições de anaerobiose. Após o quarto repique, a cepa de *C. tetani* foi cultivada em meio Mueller-Miller pH 7,2 suplementado com NZ-case TT (Sheffield Corp., EUA) por 72h a 35°C sob aeração e agitação. A pureza do cultivo foi monitorada por semeadura em ágar cérebro-coração em condições de aerobiose, seguida de coloração pelo método de Gram. A produção e a quantificação da toxina, em unidades internacionais (UI), foram avaliadas pelo método "in vivo" L+/10 (limite morte), preconizado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1982).

A inativação da toxina tetânica foi obtida pela adição de formaldeído 37%, em concentração final de 0,5%, e incubação a 37°C por 15 a 30 dias (HEMMERT, 1971). A eficiência da inativação foi avaliada pelo método "in vivo" de inocuidade em cobaios (CODE, 1999). O toxóide tetânico foi seqüencialmente filtrado em membranas de 1 µm, 0,45 µm e 0,22 µm, purificado e concentrado a 1/10 do volume inicial por ultrafiltração em sistema Prep-scale com

membranas de porosidade de 30 kD (Millipore Corp., EUA). A quantificação do antígeno no toxóide tetânico concentrado foi determinada pelo teste de floculação como descrito por RAMON (1926).

Na formulação das vacinas, a concentração do antígeno foi padronizada em 28 Lf (limite de floculação) como dose imunizante para cobaios (VERONESI *et al.*, 1970; REYNOLDS, 1993). De acordo com o adjuvante utilizado, foram elaborados dois tipos de vacinas; a primeira com gel de hidróxido de alumínio $[Al(OH)_3]$ e a segunda com a associação $Al(OH)_3$ e DDA cloreto. A adsorção do toxóide tetânico foi efetuada pela adição lenta e gradual do $Al(OH)_3$, na concentração final de 5 mg/mL de vacina, por um período de 4h com agitação lenta e constante. Na vacina contendo a associação de adjuvantes, após a adsorção do toxóide tetânico com $Al(OH)_3$ foram adicionados 5mg de DDA cloreto por mililitro de vacina. Testes padrão de esterilidade e inocuidade foram realizados nos produtos finais seguindo metodologia do CODE (1999).

TABELA 1 – RESULTADOS DOS TÍTULOS DE ANTITOXINA TETÂNICA NO SORO DE 10 COBAIOS, 42 DIAS APÓS DOSE ÚNICA DE TOXÓIDE TETÂNICO COM DIFERENTES ADJUVANTES, QUANTIFICADOS POR SORONEUTRALIZAÇÃO EM CAMUNDONGOS (1 DOSE), LONDRINA(PR), 2002.

Grupos/Cobaios ^(a)	Adjuvantes: Título UI/mL	
	$Al(OH)_3$ ^(b)	$Al(OH)_3/DDA$ ^(c)
A-1	3,0	-
A-2	3,0	-
A-3	6,0	-
A-4	9,0	-
A-5	9,0	-
B-6	-	5,0
B-7	-	15,0
B-8	-	16,0
B-9	-	20,0
B-10	-	24,0
Média ^d	6,0 ^B	16,0 ^A

^(a) Gel de hidróxido de alumínio.

^(b) Associação do gel de hidróxido de alumínio com o DDA-Cloreto

^(c) Distribuição por ordem crescente de título.

^(d) Análise estatística pelo método de Duncan: grupos com letras diferentes apresentaram diferença estatística significativa

A avaliação da imunidade celular, do tipo hipersensibilidade cutânea tardia (DTH), foi realizada 60 dias após a vacinação. Um volume de 0,1 mL de toxóide tetânico, na concentração de 28 Lf/mL, foi inoculado pela via intradérmica

Para o teste de potência das vacinas foram utilizados três grupos de cinco cobaios albinos, com peso médio de 300g. Os animais dos grupos A e B receberam 5mL de vacina em dose única pela via subcutânea na região escapular, como preconizado pela FARMACOPÉIA BRASILEIRA (1977). O grupo A foi imunizado com o toxóide adsorvido em $Al(OH)_3$ e o grupo B com o toxóide adsorvido com a associação $Al(OH)_3$ e DDA cloreto. O grupo C (controle) foi inoculado, nas mesmas condições, com 5 mL de solução salina isotônica estéril. Antes da vacinação e 42 dias após a imunização inicial, os animais foram sangrados pela via intracardíaca para obtenção de soro. A soroneutralização foi realizada pelo teste "in vivo" em camundongos albinos de 18 a 20 gramas de peso corporal. Foram efetuadas diluições seriadas do soro dos cobaios com Lp/10 (limite paralítico) de uma toxina tetânica padronizada com 0,1 UI do soro padrão internacional (Serumstat Institute Copenhagen-OMS), segundo a metodologia descrita na BRITISH PHARMACOPOEIA (1985).

no dorso dos cobaios dos grupos A, B e C (grupo controle), utilizados no teste de potência do toxóide. A espessura da dobra da pele foi aferida com paquímetro no momento anterior e 72h após a aplicação do toxóide tetânico.

Para o tratamento estatístico dos resultados foi utilizada a análise de variância em blocos completos casualizados, com nível de significância de 5%. Para as comparações múltiplas foi empregado o teste de Duncan a 5%. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa SAS (Statistic Analysis Systems).

Resultados e Discussão

O DDA cloreto foi inócuo para os cobaios e não foram observadas reações adversas de ordem geral e/ou local nos animais que receberam a vacina com esse adjuvante. Os resultados do teste de soroneutralização de toxinas realizado em camundongos, a partir da utilização dos soros individuais e do conjunto/mistura de soros dos cobaios inoculados com as duas formulações do toxóide tetânico, são

apresentados na TABELA 1. Os resultados do teste de toxinas do grupo C (controle) não foram incluídos na TABELA 1, pois esses foram negativos.

No conjunto/mistura de soros dos animais do grupo A, constituído pelos cobaios vacinados com toxóide tetânico adsorvido apenas com o Al(OH)₃, foi detectada resposta sorológica (título de 6,0 UI/mL) inferior à observada no grupo B, cujo título médio foi de 16 UI/mL. Esse resultado demonstra que o DDA cloreto, quando associado ao Al(OH)₃, apresenta efeito sinérgico que potencializa a resposta imune humoral. O sinergismo do DDA com outros adjuvantes também foi observado por GRUBHOFER (1995) que verificou potencialização na resposta humoral de coelhos imunizados com soroalbumina bovina, tendo como adjuvante o DDA associado ao peptideoglicano GMDP.

TABELA 2 – AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE CUTÂNEA TARDIA (DTH), 60 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO DE COBAIOS COM TOXÓIDE TETÂNICO, E DUAS FORMULAÇÕES DE ADJUVANTES, LONDRINA(PR), 2002.

Grupos / Cobaios ⁽¹⁾	Espessura da pele / mm		
	0 horas	72 horas	Diferença ⁽²⁾
GRUPO A			
A-1	2,5	2,5	0,00
A-2	2,5	3,0	0,30
A-3	2,5	2,5	0,00
A-4	2,5	2,8	0,30
A-5	3,5	3,5	0,00
	Média		0,12 ^B
GRUPO B			
B-1	3,5	5,5	2,0
B-2	2,0	4,0	2,0
B-3	2,0	4,2	2,2
B-4	2,5	4,5	2,0
B-5	2,5	5,0	2,5
	Média		2,14 ^A
GRUPO C			
C-1	2,5	3,0	0,50
C-2	2,0	2,0	0,00
C-3	2,5	3,0	0,50
C-4	2,0	2,0	0,00
C-5	2,5	2,5	0,00
	Média		0,20 ^B

⁽¹⁾ Grupo: A: Gel de hidróxido de alumínio; B: Associação do gel de hidróxido de alumínio com o DDA-Cloreto; C: Solução salina isotônica (controle).

⁽²⁾ Análise estatística pelo método de DUNCAN: os grupos com a mesma letra não apresentaram diferença estatística significativa.

A BRITISH PHARMACOPOEIA (1985) preconiza o título neutralizante de 7,5 UI/mL para conjunto/mistura de soros de cobaios vacinados com o toxóide tetânico, em duas doses com intervalo de 21 a 28 dias. Neste trabalho, utilizando-se apenas uma dose da vacina com a associação dos adjuvantes Al(OH)₃ e DDA cloreto, o resultado obtido para o conjunto/mistura de soros (16UI/mL) foi 2,13 vezes superior ao valor mínimo recomendado internacionalmente, demonstrando grande atividade imunogênica do toxóide tetânico quando associado ao DDA cloreto. Por outro lado, o uso do Al(OH)₃ como adjuvante em dose única não foi suficiente para atingir o título mínimo de 7,5 UI/mL. No grupo A, três dos cinco animais vacinados não atingiram título satisfatório de antitoxina tetânica para aprovação no teste. Entretanto, no grupo B apenas um dos cinco animais não atingiu título de 7,5UI/mL na primeira inoculação. Ainda nesse grupo, os quatro animais restantes atingiram títulos, no mínimo, duas vezes superior ao preconizado indicando que, quando o DDA cloreto foi incluído na formulação da vacina, obteve-se maior homogeneidade na resposta sorológica. Esses resultados sugerem que vacinas de toxóide tetânico, elaboradas com a associação do Al(OH)₃ e DDA cloreto poderiam, quando aplicadas em grande escala, determinar maior freqüência de animais efetivamente imunizados.

Esquemas complexos de imunização com o emprego do toxóide tetânico, os quais recomendam de duas a três doses de vacina, favorecem o aparecimento de reações de hipersensibilidade e devem ser evitados. A obtenção da soroconversão em níveis protetores a partir de dose única de vacina pode representar grande evolução na imunoprofilaxia do tétano (VERONESI *et al.*, 1970).

O DDA brometo induz potente resposta imune celular do tipo DTH, porém os dados relativos ao DDA cloreto ainda são escassos (ANDERSEN, 1994; SILVA *et al.*, 1998). A resposta imune celular não é de fundamental importância para a profilaxia do tétano, não sendo exigida nos testes de potência do toxóide tetânico. Entretanto além da finalidade de contribuir com informações adicionais sobre o potencial adjuvante do DDA cloreto, esse

trabalho também avaliou a DTH dos cobaios imunizados. O grupo de cobaios que recebeu a vacina de toxóide tetânico com a associação de adjuvantes Al(OH)₃ e DDA cloreto apresentou DTH equivalente, mas 17,8 vezes superior em relação ao grupo que recebeu a formulação antigênica adsorvida apenas com o Al(OH)₃. Os dados relativos à espessura da pele dos cobaios dos dois grupos de vacinas são apresentado TABELA 2.

O DDA cloreto é um produto similar ao DDA brometo que, devido à sua utilização em escala industrial como antiestático e amaciante (RECK, 1983), apresenta custo bastante inferior ao DDA brometo. O fator econômico, associado ao potencial imunogênico do adjuvante do DDA cloreto e a ausência de efeitos colaterais, tornam o produto particularmente interessante para uso como adjuvante de vacinas empregadas para profilaxia do tétano, tanto em medicina humana quanto veterinária.

Referências

ANDERSEN, P. The T cell response to secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunobiology*, Stuttgart, v.191, n.4-5, p.537-547, 1994.

BONANNI, P. Demographic impact of vaccination: a review. *Vaccine*, Oxon, v.17, sup.3, p.120-125, 1999.

BRABEK E.; KRANKE B.; STUNZNER D.; ABERER, W. Epidemiologic data for tetanus prophylaxis. Assessment of the need for vaccination. *Wiener Klinische Wochenschrift*, Vienna, v.111, n.20, p.851-854, 1999.

BRITISH PHARMACOPOEIA: Veterinary. London: HMSO, 1985. Apêndice 14 B, p.A116.

BRODERSON, J.R. A retrospective review of lesions associated with the use of Freund's adjuvant. *Laboratory Animal Science*, Joliet, IL, v.39, p.426-434, 1989.

CATES, C.J. A handout about tetanus immunisation: influence on immunisation rate in general practice. *British Medical Journal*, London, v.300, n.6727, p.789-790, 1990.

CODE of Federal Regulations: Animal and animals products. Washington. United States Agricultural Department, 1999, Title 9, v.1, Parts 1 to 199.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3.ed. São Paulo: Organização Andrei, 1977. p.877-878.

GALL, D. The adjuvant activity of aliphatic nitrogenous bases. **Immunology**, Oxford, v.11, p.369-386, 1966.

GRUBHOFER, N. An adjuvant formulation based on *N*-acetylglucosamyl-*N*-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine with dimethyldioctadecylammonium chloride and zinc-L-proline complex as synergists. **Immunology Letters**, v.44, p.19-24, 1995.

HEMMERT, P.V. **Vaccine production as a unit process**. Utrecht: Drukkerij elinkwijk, 1971.

HILGERS, L.A.; SNIPPE, H. DDA as an immunological adjuvant. **Research in Immunology**, Paris, v.143, n.5, p.494-503, 1992.

PREVOTS, R.; SUTTER, R.W.; STREBEL, P.M.; COCHIL, S.L.; HADLER, S. Tetanus surveillance-United States, 1989-1990. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, CDC, Atlanta, v.11, n. 41, p1-9, 1992.

RAMON, G. Procédés pour accroître la production des antitoxines. **Annales de l'Institut Pasteur**, Paris, v.40, p.1-10, 1926.

RECK, R.A. Quaternary ammonium compounds. In: MARK, D.F. et al (eds). **Encyclopedia of chemical Technology**. New York: J. Wiley and Sons, 1983, v.19, p.521-531.

REYNOLDS, J.E.F. (Ed.). **Martindale: the extra Pharmacopoeia**. 30.ed. London: The Pharmaceutical Press, 1993, p.1300-1304.

SILVA, R.A.; PAIS, T.F.; APPELBERG, R. Evaluation of IL-12 in immunotherapy and vaccine design in experimental *Mycobacterium avium* infections. **Journal of Immunology**, Baltimore, MD, v.161, n.10, p.5578-5585, 1998.

STANFIELD, J.P.; GALL, D; BRACKEN, P.M. Single-dose antenatal tetanus immunization. **Lancet**, London, v.301, p.215-219, 1973.

UNGAR, J. Panel and discussions on Immunology. In: BERN & STUTGART **Principles on Tetanus**. Hans Huber Publ. (ed) 1966, p.323-329.

VERONESI, R.; CORREA, A.; ALTÉRIO, D. Single dose immunization against tetanus. Promising results in human trials. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.12, p.46-54, 1970.

WHO WORLD HEALTH ORGANIZATIONS. **Manual of details of tests required on final vaccines used in the WHO Expanded Programme of Immunization.**, 1982 BLG/UNDP/ p.82-81.

Recebido: 13/01/2003

Aprovado: 02/06/2003