

Vacinas e Sua Produção

OBJETIVOS DIDÁTICOS

p0115	Depois de ler este capítulo, você deve ser capaz de:		
u0110	• Descrever como um animal pode ficar imune à infecção por meio da imunização passiva ou ativa.	• Explicar o processo de atenuação.	u0145
u0115	• Explicar como a imunização passiva funciona, bem como seus benefícios e desvantagens.	• Explicar como a deleção de gene alvo é superior aos primeiros métodos de atenuação.	u0150
u0120	• Descrever como funciona a imunização ativa.	• Explicar o funcionamento das vacinas de polinucleotídeos.	u0155
u0125	• Comparar as vantagens e as desvantagens das vacinas vivas e inativadas.	• Definir atenuação, adjuvantes, viva modificada, vacinas DIVA, <i>prime-boost</i> e vacinologia reversa.	u0160
u0130	• Listar as vantagens dos antígenos clonados.	• Explicar a importância da identificação de vacinas essenciais e não essenciais.	u0165
u0135	• Explicar como os adjuvantes adicionados às vacinas aumentam sua eficácia.	• Entender o que controla a duração da imunidade.	u0170
u0140	• Descrever as características de uma vacina ideal.	• Explicar as vantagens e as desvantagens dos adjuvantes.	u0175
		• Explicar os mecanismos de ação dos adjuvantes comuns.	u0180

SUMÁRIO DO CAPÍTULO

u0010	Tipos de procedimentos de imunização, 261	Vacinas de Polinucleotídeos (Categoria IV), 268	u0060
u0015	Imunização passiva, 261	<i>Estratégias de Sensibilização e Reforço (Prime-Boost),</i>	u0065
u0020	Imunização ativa, 263	269	
u0025	Vacinas Vivas e Inativadas, 264	Vacinologia Reversa, 270	u0070
u0030	Inativação, 264	Adjuvantes, 270	u0075
u0035	Atenuação, 265	Sais de Alumínio, 270	u0080
u0040	Tecnologia moderna de vacinação, 265	Adjuvantes à Base de Saponina, 271	u0085
u0045	Antígenos Gerados por Clonagem de Genes (Categoria I), 265	Emulsões de Água em Óleo, 271	u0090
u0050	Microrganismos Geneticamente Atenuados (Categoria II), 267	Adjuvantes Particulados, 272	u0095
u0055	Microrganismos Recombinantes Vivos (Categoria III), 267	Adjuvantes Imunoestimuladores, 272	u0100
		Adjuvantes Combinados, 273	u0105

p0195 A vacinação é, de longe, o método mais eficiente e barato para controle de doenças infecciosas em seres humanos e animais. A erradicação global da varíola e da peste bovina, a eliminação da cólera suína e da brucelose em muitos países e o controle de doenças como a febre aftosa, a cinomose, a raiva, a influenza e a pseudorraiva (doença de Aujeszky) não seriam possíveis sem o uso de vacinas eficazes. As vacinas estão entre os maiores triunfos da medicina moderna.

TIPOS DE PROCEDIMENTOS DE IMUNIZAÇÃO

p0200 Há dois procedimentos para que qualquer animal fique imune a uma doença infecciosa (Fig. 24.1): a imunização passiva e a imunização ativa. A imunização passiva produz imunidade temporária ao transferir anticorpos de um animal resistente para outro suscetível. Esses anticorpos transferidos de forma passiva (ou antissoro) conferem proteção imediata, mas, por

sofrem catabolismo gradual, essa proteção diminui e o receptor volta a ser suscetível.

A imunização ativa, por outro lado, é feita com a administração de antígenos a um animal para que este responda e monte uma resposta imune. Uma nova imunização ou a exposição do mesmo animal à infecção gera uma resposta imunológica secundária, com grande melhora da imunidade. A desvantagem da imunização ativa é que, como em todas as respostas adaptativas, a proteção não é conferida imediatamente. Entretanto, uma vez estabelecida, apresenta durabilidade longa e é passível de novo estímulo (Fig. 24.2).

IMUNIZAÇÃO PASSIVA

A imunização passiva requer a produção de anticorpos por animais doadores submetidos à imunização ativa e a administração desses anticorpos aos animais suscetíveis para conferir

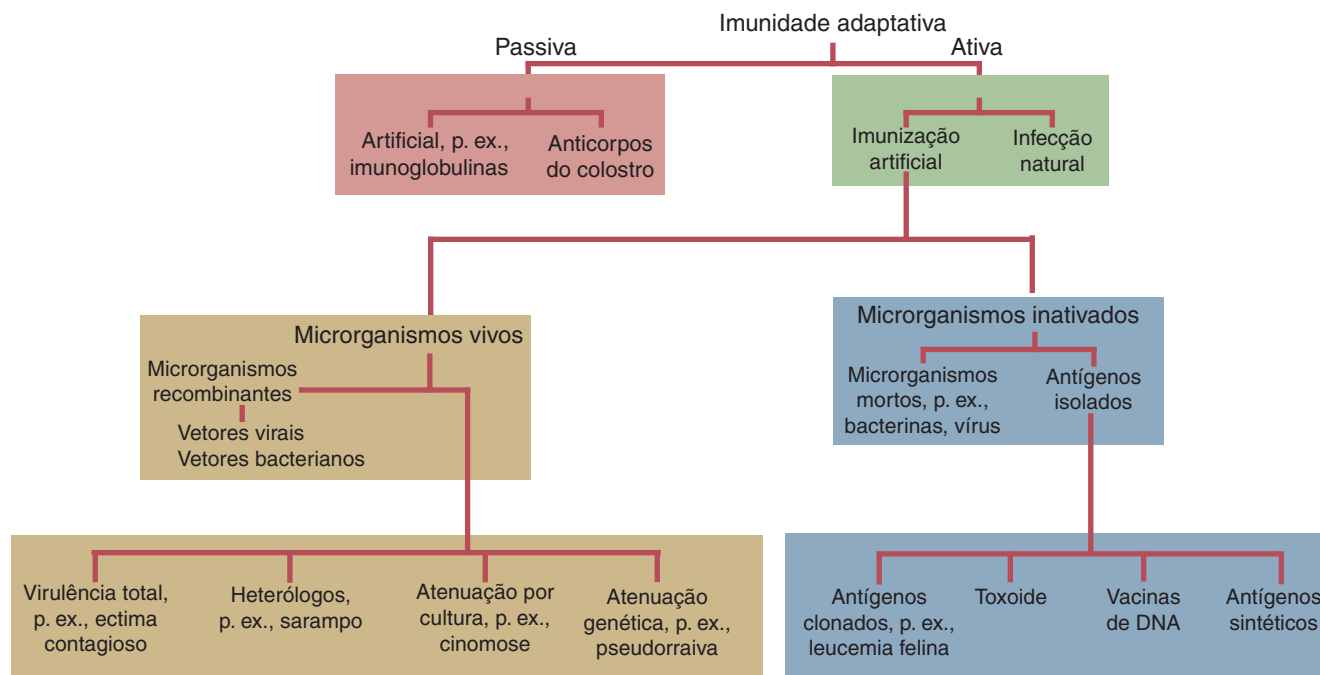


FIG. 24.1 Uma classificação dos diferentes tipos de imunidade adaptativa e dos métodos empregados na indução da proteção.

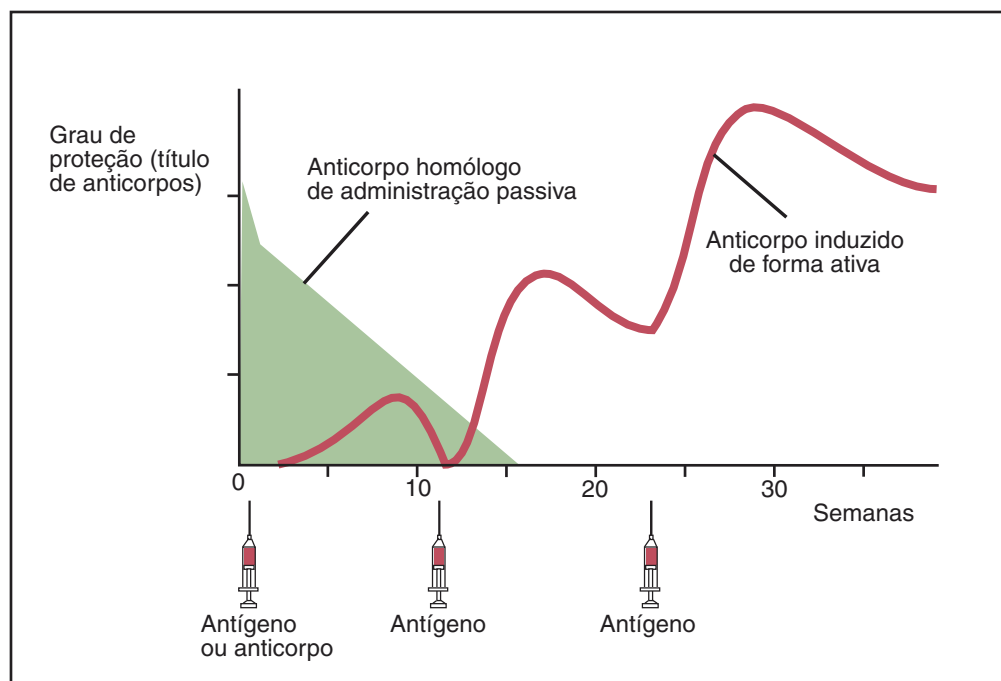


FIG. 24.2 Os níveis séricos de anticorpos (e, consequentemente, o grau de proteção) conferidos pelos métodos ativos e passivos de imunização.

proteção imediata. Os soros com esses anticorpos (antissoros ou imunoglobulinas) podem ser produzidos contra uma ampla gama de patógenos. Podem, por exemplo, ser produzidos em bovinos, contra o antraz; em cães, contra a cinomose; ou em gatos, contra a panleucopenia. São mais eficazes na proteção dos animais contra organismos toxigênicos, como *Clostridium tetani* ou *Clostridium perfringens*, usando antissoros produzidos em equinos. Os antissoros sintetizados dessa forma são chamados de imunoglobulinas e normalmente são produzidos

por equinos jovens submetidos a uma série de injeções imunizantes. As toxinas clostrídicas são proteínas que podem ser desnaturadas e detoxificadas pelo tratamento com formaldeído. As toxinas tratadas com formaldeído são denominadas toxoides. A princípio, os cavalos doadores recebem toxoides, mas, durante a produção de anticorpos, as injeções subsequentes podem conter a toxina purificada. As respostas dos equinos são monitoradas e, quando os títulos de anticorpos são suficientemente elevados, o sangue é coletado. A coleta de sangue é realizada em intervalos,

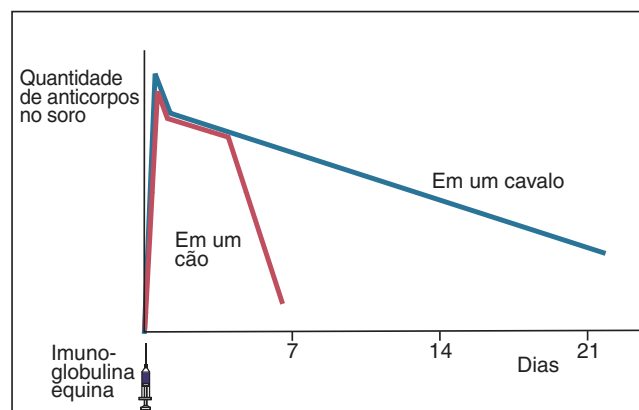
até que o título de anticorpos caia; nesse momento, os animais recebem uma dose de reforço do antígeno. O plasma é separado do sangue e a fração das globulinas que contém os anticorpos é concentrada, titulada e envasada.

p0215 A padronização da potência de diferentes imunoglobulinas é feita por comparação a um padrão biológico internacional. No caso do soro antitetânico, esse processo é realizado pela comparação da dose necessária para proteger cobaias contra uma quantidade definida de toxina tetânica. O padrão internacional para a imunoglobulina contra o tétano é uma quantidade determinada pelo State Serum Institute em Copenhague, na Dinamarca. Uma unidade internacional (IU) de imunoglobulina antitetânica é a atividade neutralizante específica contida em 0,03384 mg do padrão internacional. A unidade padrão americana (AU) é o dobro da unidade internacional.

p0220 A imunoglobulina antitetânica é administrada aos animais para conferir proteção imediata contra o tétano. Pelo menos 1.500 a 3.000 IU de imunoglobulina devem ser administradas em equinos e bovinos; pelo menos 500 IU em bezerros, ovinos, caprinos e suínos; e pelo menos 250 IU em cães. A quantidade exata varia conforme a extensão da lesão tecidual, o grau de contaminação da ferida e o tempo transcorrido desde a lesão. A administração de 300.000 IU de imunoglobulina antitetânica por via intravenosa foi eficaz no tratamento da doença clínica em equinos.

p0225 Embora as imunoglobulinas confirmem proteção imediata, alguns problemas são associados à sua utilização. Em caso de administração de uma imunoglobulina antitetânica equina a uma vaca ou um cão, por exemplo, as proteínas equinas são reconhecidas como estranhas, desencadeiam uma resposta imune e são rapidamente eliminadas (Fig. 24.3). De modo geral, a antigenicidade das imunoglobulinas é reduzida por meio do tratamento com pepsina para destruir a região Fc; assim, apenas a porção da molécula da imunoglobulina necessária à neutralização da toxina, o fragmento F(ab)₂, permanece intacta.

p0230 Se ainda houver anticorpos equinos circulantes quando o animal receptor montar a resposta imune, os imunocomplexos formados podem causar uma reação de hipersensibilidade do tipo III denominada doença do soro (Capítulo 32). A administração de doses repetidas de antissoro equino a um animal de outra espécie pode levar à produção da imunoglobulina E (IgE)



f0020 **FIG. 24.3** O destino da imunoglobulina equina administrada de forma passiva a uma espécie homóloga (*cavalo*) ou heteróloga (*cão*).

e ao desenvolvimento de anafilaxia (Capítulo 30). Por fim, a presença de níveis elevados de anticorpos equinos circulantes pode interferir na imunização ativa contra o mesmo antígeno. Esse fenômeno é semelhante ao observado em neonatos passivamente protegidos por anticorpos maternos.

Os anticorpos monoclonais são outra fonte de proteção passiva. Contudo, esses anticorpos são produzidos principalmente por hibridomas de camundongos, sendo, portanto, imunoglobulinas murinas. Por isso, são antigênicos quando administrados a outras espécies. Ainda assim, os anticorpos monoclonais de camundongos contra os antígenos K99 dos pili de *Escherichia coli* podem ser administrados por via oral a bezerros para protegê-los contra a diarreia causada por esse microrganismo. Um anticorpo monoclonal de camundongo contra células de linfoma foi usado no tratamento de cães. Os anticorpos monoclonais, especialmente quando modificados de acordo com a espécie receptora, são cada vez mais utilizados no tratamento de doenças inflamatórias e tumorais em humanos e animais (Capítulos 35 e 38).

Devido à necessidade de grandes volumes de fluidos ricos em imunoglobulinas durante a imunização passiva de animais de produção, a metodologia convencional descrita acima pode não obter a quantidade suficiente de anticorpos (ou ser muito cara). Algumas alternativas são a utilização de spray de plasma seco de sangue normal suíno como aditivo alimentar, que contém cerca de 20% de imunoglobulinas, e soro de leite da produção de queijo, cuja fração proteica possui cerca de 10% imunoglobulinas.

IMUNIZAÇÃO ATIVA

A imunização ativa tem diversas vantagens em relação à imunização passiva. Entre as vantagens estão o período de proteção contínua, a memória e o reforço dessa resposta protetora por meio de injeções repetidas do antígeno ou exposição à infecção. A vacina ideal para a imunização ativa deve, portanto, propiciar uma imunidade forte. Essa imunidade deve ser conferida tanto ao animal imunizado quanto a seus fetos, caso existam. Na obtenção dessa imunidade potente, a vacina não deve apresentar efeitos colaterais adversos. (Na verdade, deve estimular a imunidade adaptativa sem desencadear a inflamação associada à imunidade inata.) A vacina ideal deve ser barata, estável e adaptável à vacinação em massa, além de estimular uma resposta imune distinguível daquela resultante da infecção natural para que a imunização e a erradicação possam ser realizadas de maneira simultânea.

Além disso, as vacinas eficazes devem apresentar outras propriedades essenciais. Primeiramente, o antígeno deve ser apresentado de forma eficiente, para que as células apresentadoras de antígenos possam processá-lo e secretar as citocinas adequadas. Em segundo lugar, linfócitos T e B devem ser estimulados para que gerem grandes números de células de memória e, assim, a proteção seja a mais duradoura possível. Em terceiro lugar, linfócitos T auxiliares e efetores devem ser gerados para diversos epítomos vacinais, de modo que as variações individuais em polimorfismos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II e nas propriedades do epítipo sejam minimizadas. Em quarto lugar, a resposta imune desencadeada pela vacina deve ser adequada ao agente infeccioso, ou seja, humoral ou celular.

st0035 Vacinas Vivas e Inativadas

p0255 Infelizmente, dois dos pré-requisitos para uma vacina ideal, a antigenicidade alta e a ausência de efeitos colaterais adversos, são, às vezes, incompatíveis. As vacinas vivas modificadas infectam as células do hospedeiro e sofrem replicação. As células infectadas, então, processam o antígeno endógeno. Dessa forma, os vírus vivos desencadeiam uma resposta dominada por linfócitos T citotóxicos CD8⁺, uma resposta de tipo 1. Isso pode ser prejudicial, já que os vírus vacinais podem, sozinhos, causar doença ou infecção persistente (devido à virulência residual). Os microrganismos inativados, por outro lado, atuam como antígenos exógenos. De modo geral, essas vacinas estimulam respostas de tipo 2, dominadas por linfócitos CD4⁺ e anticorpos. Essa pode não ser a resposta mais adequada a alguns microrganismos, mas pode ser a mais segura. As células dendríticas respondem de forma diferente às bactérias vivas e inativadas.

p0260 As vantagens e desvantagens práticas das vacinas com microrganismos vivos ou inativados são bem demonstradas nas vacinas contra *Brucella abortus* para bovinos. *B. abortus* causa aborto em bovinos e a vacinação é historicamente usada no controle da doença. As infecções por *Brucella* são mais bem controladas por respostas imunes do tipo 1, com ativação de macrófagos, produção de interferon γ (IFN- γ) por linfócitos Th1 e linfócitos T CD8⁺ citotóxicos. A vacina com uma cepa viva avirulenta de *B. abortus* é necessária para a indução dessas respostas e o controle da infecção. As vacinas atenuadas mais antigas contra *Brucella*, sobretudo a cepa 19, produziam imunidade vitalícia e eram eficazes na prevenção dos abortos. Infelizmente, a vacina contra a cepa 19 também provocou reações sistêmicas: edema no local de injeção, febre alta, anorexia, apatia e queda na produção leiteira. A cepa 19 pode causar aborto em vacas prenhes, orquite em touros e febre oscilante em seres humanos. O programa de erradicação da brucelose utiliza exames sorológicos para identificar os animais infectados e a cepa 19 provoca uma resposta anticórpica difícil de distinguir daquela observada na infecção natural.

p0265 Devido às desvantagens associadas ao uso da cepa 19, esforços consideráveis têm sido empreendidos para encontrar uma alternativa melhor. Infelizmente, as vacinas inativadas (cepa 45/20) protegeram os bovinos por menos de 1 ano. Uma cepa atenuada de *B. abortus* chamada RB-51 está sendo usada em bovinos nos Estados Unidos. Essa é uma cepa mutante rugosa que não produz o antígeno O do lipopolissacarídeo. A RB-51 gera uma resposta Th1 acentuada, com produção de IFN- γ e linfócitos T CD8⁺ citotóxicos. Diferentemente da cepa 19, não induz resultados falsos-positivos nos exames diagnósticos comuns, como a aglutinação em cartão, a fixação de complemento e a aglutinação em tubo. Assim, pode distinguir os bovinos vacinados dos infectados. A RB-51 é menos patogênica para os bovinos do que a cepa 19 e não é eliminada em secreções nasais, na saliva ou na urina. A RB-51 não causa aborto em vacas prenhes. No entanto, causa a doença em humanos expostos de maneira acidental e, por não estimular a produção de anticorpos, seu diagnóstico pode ser difícil.

p0270 As vantagens de vacinas inativadas como a cepa 45/20 de *Brucella* são a segurança em relação à virulência residual e a relativa facilidade de armazenamento, uma vez que os microrganismos já estão inativados (Tabela 24.1). Essas vantagens correspondem às desvantagens das vacinas vivas, como a cepa 19 ou a RB-51. Ou seja, algumas vacinas vivas podem apresentar

TABELA 24.1 Os Méritos Relativos das Vacinas Vivas e Inativadas

Vacinas Vivas	Vacinas Inativadas
O número de doses pode ser menor	Estabilidade ao armazenamento
Não há necessidade de uso de adjuvantes	Baixa probabilidade de doença por virulência residual
Menor chance de hipersensibilidade	Não há replicação no receptor
Indução de interferon	Baixa probabilidade de contaminação por microrganismos
Custo relativamente baixo	Não há disseminação para outros animais
A dose pode ser menor	Seguro em pacientes imunodeficientes
A administração pode ser feita pela via natural	Armazenamento mais fácil
Estimulação de respostas celulares e humorais	Menor custo de desenvolvimento
Proteção mais prolongada	Não há risco de reversão

virulência residual, não só para o animal a quem se destina, mas também para outros indivíduos. Esses microrganismos podem voltar a ser um tipo inteiramente virulento ou ser disseminados para animais não vacinados. As vacinas vivas sempre apresentam o risco de contaminação por organismos indesejáveis; surtos de reticuloendoteliose em frangos no Japão e na Austrália, por exemplo, foram relacionados à contaminação de vacinas da doença de Marek. Um surto de leucose bovina na Austrália foi causado pela contaminação de um lote de vacina contra a babesiose por sangue total de bezerros. Houve aborto e morte em cadelas prenhes que receberam uma vacina contra a parvovirose contaminada com o vírus da língua azul. Algumas vacinas foram contaminadas por *Mycoplasma*. A paraplexia enzoótica dos ovinos (*scrapie*) foi disseminada por vacinas contra *Mycoplasma*. Por fim, as vacinas de microrganismos vivos atenuados exigem cuidados na preparação, no armazenamento e no manuseio para evitar a morte dos micróbios. A manutenção da cadeia fria pode ser responsável por 20% a 80% dos custos de uma vacina nos trópicos.

As desvantagens das vacinas inativadas correspondem às vantagens das vacinas vivas. O uso de adjuvantes para aumentar a antigenicidade efetiva pode causar inflamação grave ou toxicidade sistêmica, enquanto doses múltiplas ou individuais elevadas do antígeno aumentam o risco de desenvolvimento de reações de hipersensibilidade e elevam os custos.

Inativação

Os microrganismos inativados usados em vacinas devem apresentar antigenicidade o mais semelhante possível àquela apresentada pelos micróbios vivos. Portanto, métodos rudimentares de inativação que provocam grandes modificações da estrutura antigênica devido à desnaturação proteica tendem a ser insatisfatórios. Substâncias químicas, caso utilizadas, não devem alterar os antígenos responsáveis pelo estímulo da imunidade protetora. Uma dessas substâncias é o formaldeído, que provoca a formação de ligações cruzadas entre as proteínas e os ácidos

nucleicos e confere rigidez estrutural. As proteínas também podem sofrer desnaturação branda durante o tratamento com acetona ou álcool. Os agentes alquilantes que interagem com cadeias de ácidos nucleicos também podem ser utilizados na inativação de microrganismos porque, ao não alterarem as proteínas de superfície, não interferem com a antigenicidade. Entre os exemplos de agentes alquilantes, estão o óxido de etileno, a etilenoimina, a acetilenoimina e a β -propiolactona; todas essas moléculas são empregadas em vacinas veterinárias. Muitas vacinas eficazes com bactérias inativadas (bacterinas) ou toxinas inativadas (toxoides) podem ser produzidas de forma relativamente simples com esses agentes. Algumas vacinas podem conter misturas desses componentes. Determinadas vacinas contra *Mannheimia hemolytica*, por exemplo, apresentam bactérias mortas e leucotoxina bacteriana inativada.

Atenuação

Microrganismos vivos virulentos normalmente não podem ser utilizados em vacinas. Sua virulência deve ser reduzida para que, embora ainda vivos, não sejam mais capazes de causar doenças. Esse processo de redução da virulência é denominado atenuação. O grau de atenuação é importantíssimo para o sucesso da vacina. A atenuação insuficiente gera virulência residual e doença; a atenuação excessiva pode fazer com que a vacina seja ineficaz. Os métodos tradicionais de atenuação eram empíricos e as alterações induzidas pelo processo de atenuação eram pouco compreendidas. De modo geral, esses métodos envolviam o cultivo dos microrganismos em condições incomuns para que perdessem a adaptação ao seu hospedeiro habitual. A cepa do bacilo Calmette-Guérin (BCG) do *Mycobacterium bovis*, por exemplo, ficou avirulenta depois de 13 anos de cultura em meio saturado com bile. A cepa vacinal do antraz ficou avirulenta depois do cultivo em ágar suplementado com soro a 50% e atmosfera rica em CO₂, perdendo a capacidade de formação de cápsula. A vacina com a cepa 19 de *B. abortus* foi cultivada em condições de escassez nutricional. Infelizmente, a estabilidade genética dessas cepas atenuadas nem sempre pode ser garantida. Mutações reversas ou o rearranjo genômico com genes de vírus semelhantes podem permitir que os microrganismos atenuados voltem a desenvolver sua virulência.

Um método mais confiável de tornar as bactérias avirulentas é a manipulação genética. Por exemplo, existe uma vacina viva modificada com *M. hemolytica* e *Pasteurella multocida* dependentes de estreptomicina. Esses mutantes dependem da presença de estreptomicina para o seu crescimento. Após a administração ao animal, a ausência de estreptomicina provoca a morte das bactérias, mas não antes de estimular uma resposta imune protetora.

Os vírus costumam ser atenuados pelo cultivo em células ou espécies às quais não são naturalmente adaptados. O vírus da peste bovina, por exemplo, em geral um patógeno de bovinos, foi atenuado pela primeira vez por crescimento em coelhos. Por fim, uma vacina contra a peste bovina adaptada para cultura de tecidos e desprovida de virulência residual foi desenvolvida. Exemplos semelhantes são a adaptação do vírus da doença equina africana em camundongos e do vírus da cinomose canina em furões. Como alternativa, os vírus que afetam mamíferos podem ser atenuados pela cultura em ovos. A cepa Flury da raiva, por exemplo, foi atenuada pela passagem prolongada em ovos e perdeu sua virulência em cães e gatos normais.

O método tradicional de atenuação viral é a cultura prolongada em tecidos. Nesses casos, a atenuação viral é feita pelo cultivo do microrganismo em células às quais não está adaptado. O vírus da cinomose canina, por exemplo, ataca preferencialmente as células linfoides. No desenvolvimento da vacina, portanto, esse vírus foi cultivado em células renais de cão. Ao se adaptar às condições de cultivo, o vírus perdeu a habilidade de causar doença grave.

Em determinadas circunstâncias, é possível usar microrganismos com virulência total na imunização. Isso acontece na vacinação contra o ectima contagioso dos ovinos. O ectima contagioso (orf) é uma doença viral que atinge os cordeiros e provoca a formação de crostas peribucais extensas, o que impede a alimentação e o bom desenvolvimento dos animais. A doença apresenta poucos efeitos sistêmicos. Os cordeiros se recuperam completamente em poucas semanas e, então, se tornam imunes. Em geral os cordeiros são vacinados esfregando o material infectado seco das crostas em ranhuras no lado interno da coxa. A infecção local desse sítio não tem efeitos adversos sobre os cordeiros, que ficam bem imunizados. Porém, como os animais vacinados podem transmitir a doença, devem ser separados dos indivíduos não vacinados por algumas semanas.

TECNOLOGIA MODERNA DE VACINAÇÃO

Embora as vacinas inativadas e vivas modificadas sejam eficazes no controle de muitas doenças infecciosas, sempre há a necessidade de torná-las ainda mais eficientes, baratas e seguras (Fig. 24.4). O uso de técnicas moleculares modernas pode produzir vacinas novas e melhores. Essas vacinas podem ser divididas em diversas categorias (Tabela 24.2).

Antígenos Gerados por Clonagem de Genes (Categoria I)

A clonagem gênica pode ser utilizada na produção de grandes quantidades de antígeno purificado em cultivo. Nesse processo, o DNA que codifica um antígeno de interesse é, primeiramente, isolado do patógeno. Esse DNA é, então, inserido em uma bactéria ou levedura para que seja funcional e o antígeno recombinante seja expresso em grandes quantidades. A primeira aplicação bem-sucedida da clonagem gênica para o preparo de um antígeno dessa forma foi com o vírus da febre aftosa (Fig. 24.5). Esse vírus é extremamente simples. O antígeno protetor (VP1) é bem conhecido e os genes que codificam essa proteína foram mapeados. O genoma do RNA do vírus da febre aftosa foi isolado e transcrito em DNA pela enzima transcriptase reversa. O DNA foi, então, cuidadosamente clivado por endonucleares de restrição para que contivesse apenas o gene de VP1. Esse DNA foi inserido em um plasmídeo, que foi colocado em *E. coli* e as bactérias foram cultivadas. As bactérias sintetizaram grandes quantidades de VP1, que foi recuperado, purificado e incorporado em uma vacina. O processo é altamente eficaz, uma vez que podem-se obter 4×10^7 doses da vacina contra a febre aftosa a partir de 10 L de cultura de *E. coli* com 10^{12} microrganismos por mililitro. Infelizmente, a imunidade produzida é inferior à gerada pelo vírus inativado, exigindo uma dose 1.000 vezes maior para a indução de proteção equivalente.

A primeira vacina veterinária recombinante da categoria I a ser comercializada foi produzida contra o vírus da leucemia felina (FeLV). A principal proteína do envelope do FeLV, a gp70, é o antígeno responsável, em grande parte, pela indução da

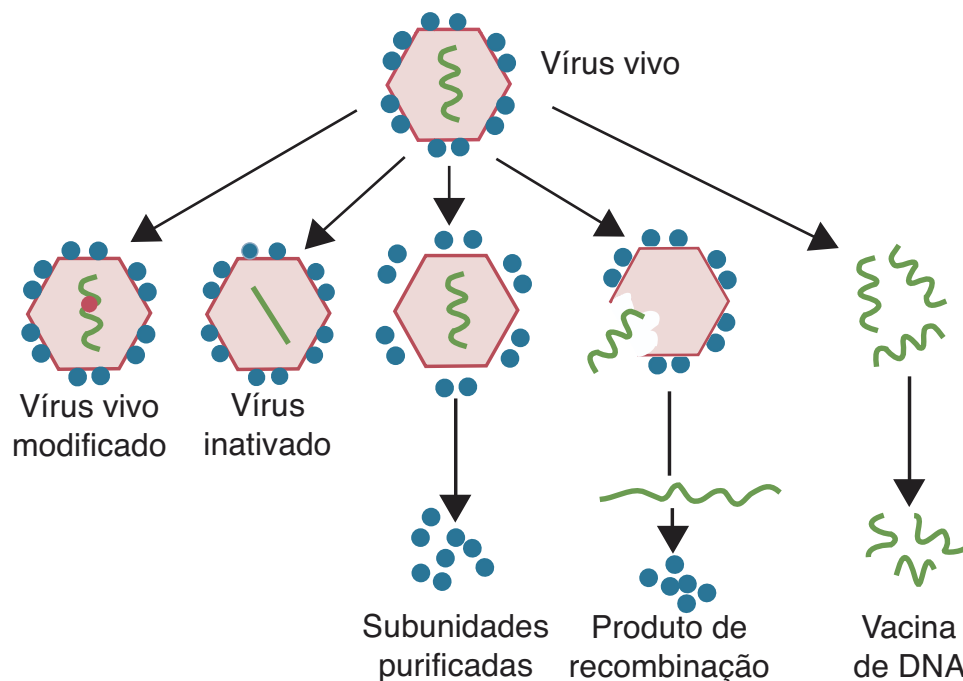


FIG. 24.4 Diagrama esquemático que mostra algumas das diferentes formas de tratamento de um vírus e seus antígenos para produção de vacinas.

TABELA 24.2 Classificação do Ministério da Agricultura dos Estados Unidos (USDA) de Biológicos Veterinários Desenvolvidos por Engenharia Genética

Categoria	Descrição
I	Vacinas com microrganismos recombinantes inativados ou antígenos purificados derivados de microrganismos recombinantes
II	Vacinas com microrganismos vivos que apresentam deleções gênicas ou genes marcadores heterólogos
III	Vacinas com vetores ativos que expressam genes heterólogos de antígenos imunizantes ou outros estimulantes
IV	Outras vacinas desenvolvidas por engenharia genética, como vacinas de polinucleotídeos

resposta imune protetora em gatos. Assim, o gene de gp70 (uma glicoproteína de 70 kDa) e uma pequena parte de uma proteína associada, denominada p15e (uma proteína do envelope de 15 kDa), foram isolados e inseridos em *E. coli*, que, então, sintetizou grandes quantidades de p70. Essa p70 recombinante não é glicosilada e tem peso molecular pouco superior a 50 kDa. Depois de clonada, a proteína recombinante é recuperada, purificada, misturada a um adjuvante de saponina e utilizada como vacina.

Outro exemplo é a vacina recombinante contra o agente da doença de Lyme, *Borrelia burgdorferi*. Portanto, o gene de OspA, a lipoproteína imunodominante de superfície externa de *B. burgdorferi*, foi clonado em *E. coli*. A proteína recombinante expressa por *E. coli* é purificada e utilizada como vacina depois de ser complexada a um adjuvante. Essa vacina é única, pois os carrapatos de animais imunizados ingerem o anticorpo. Os anticorpos, então, matam a bactéria no intestino do carrapato,

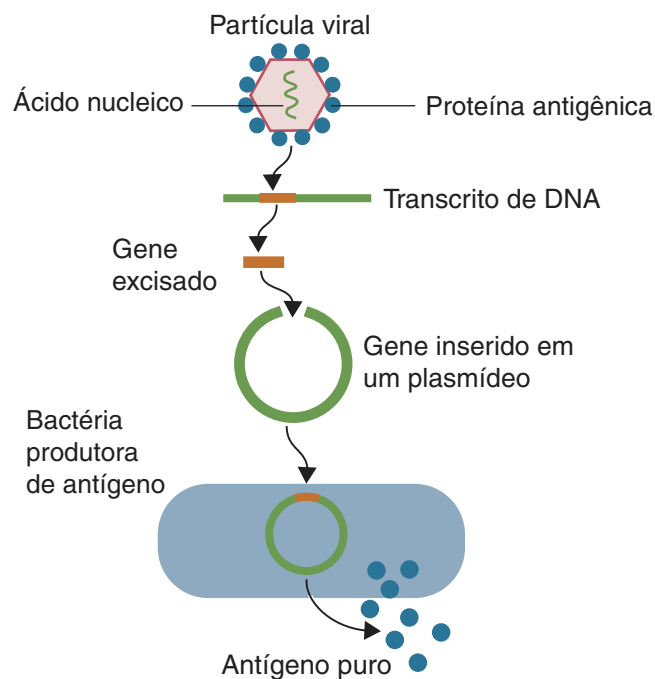


FIG. 24.5 A produção de uma proteína viral recombinante para uso em uma vacina. O gene que codifica o antígeno viral de interesse é clonado em outro organismo, neste caso uma bactéria, e expresso e produzido em quantidades enormes.

prevenindo sua disseminação para as glândulas salivares. Dessa forma, a vacina previne a transmissão pelo vetor.

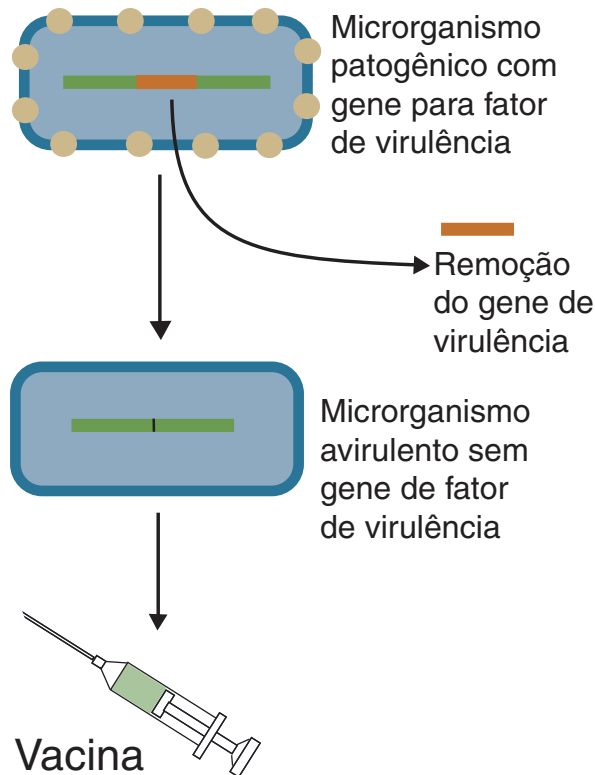
As técnicas de clonagem gênica podem ser utilizadas em qualquer situação em que haja necessidade de síntese de antígenos proteicos puros em grandes quantidades. Infelizmente, em geral as proteínas muito puras são antígenos fracos, porque não são apresentadas de forma eficaz às células sensíveis aos antígenos e

podem não estar corretamente dobradas. Um método alternativo de administração de um antígeno recombinante é a clonagem do gene de interesse em um microrganismo carreador vivo atenuado.

st0060 **Microrganismos Geneticamente Atenuados (Categoria II)**

p0335 As técnicas de genética molecular possibilitam a modificação de genes de um microrganismo para que este seja atenuado de maneira irreversível. Esses casos são classificados como vacinas da categoria II. Há uma vacina de categoria II contra o herpes-vírus causador da doença de Aujeszky em suínos. A enzima timidina quinase (TK) é necessária para que os herpes-vírus se repliquem em células indivisíveis, como os neurônios. Os vírus submetidos à remoção do gene TK podem infectar os neurônios, mas não conseguem se replicar nem causar a doença (Fig. 24.6). Dessa maneira, essas vacinas não apenas conferem proteção eficaz, mas também bloqueiam a invasão celular por vírus virulentos da doença de Aujeszky, prevenindo o desenvolvimento de um estado de portador persistente.

p0340 A manipulação genética também pode ser utilizada para produzir “vacinas marcadoras”. O vírus da doença de Aujeszky, por exemplo, sintetiza dois antígenos glicoproteicos chamados gX e gI. Essas moléculas são antígenos potentes, mas não são essenciais para o crescimento viral ou sua virulência. Os antígenos são expressos por todos os vírus isolados a campo e, assim, os animais infectados produzem anticorpos contra gX e gI. Há uma vacina atenuada contra o vírus da doença de Aujeszky sem essas proteínas. Os suínos vacinados não fazem anticorpos contra gX ou gI, ao

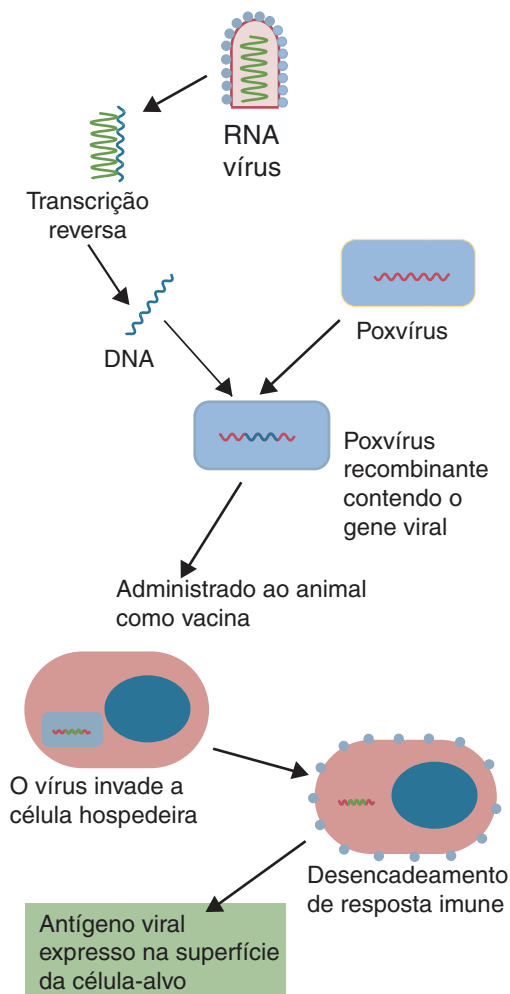


f0035 **FIG. 24.6** A produção de um vírus atenuado por remoção de um gene necessário para a virulência. Os genes que codificam os principais antígenos detectados por técnicas sorológicas também podem ser removidos, o que permite a diferenciação entre os animais vacinados e aqueles com infecção natural.

contrário dos animais naturalmente infectados. A vacina não causa reações sorológicas positivas em ensaios para detecção de anti-gX ou anti-gI, e a presença de anticorpos contra gX e gI em um animal é a evidência de sua exposição a cepas de campo do vírus da doença de Aujeszky. Esse tipo de vacina, denominado DIVA (do inglês *differentiate infected from vaccinated animals*, diferenciação de animais infectados e vacinados) auxiliará na erradicação de doenças infecciosas específicas de forma muito mais barata e rápida do que os métodos convencionais. Outro exemplo de vacina DIVA é a inserção de um gene de influenza B na vacina contra influenza A em aves. Como a influenza B não acomete aves, a presença de anticorpos anti-influenza B confirma a vacinação.

st0065 **Microrganismos Recombinantes Vivos (Categoria III)**

p0345 Os genes que codificam os antígenos proteicos podem ser clonados diretamente em diversos microrganismos. Em vez de ser purificado, o próprio microrganismo recombinante pode ser utilizado como vacina. Esses microrganismos são classificados como vacinas da categoria III (Fig. 24.7). As vacinas recombinantes experimentais têm utilizado adenovírus, herpes-vírus e bactérias,



f0040 **FIG. 24.7** A produção de uma vacina recombinante vetorizada em vaccínia. O vírus vaccínia é escolhido por ter espaço sobrando em seu genoma e ser facilmente administrado a um animal. Assim, os recombinantes raiva-vaccínia podem ser administrados por via oral.

como BCG ou *Salmonella*, como vetores, mas os microrganismos mais usados com esse fim são os poxvírus, como vaccínia, fowlpoxvírus e canaripox. Esses vírus são facilmente administrados por raspagem cutânea ou ingestão. Seus genomas são extensos e estáveis, o que facilita a inserção de um novo gene (até 10% do genoma pode ser substituído por DNA exógeno), e eles podem expressar níveis altos do novo antígeno. Além disso, essas proteínas recombinantes são submetidas a etapas adequadas de processamento, inclusive glicosilação e transporte através da membrana do poxvírus. Os poxvírus aviários, como canaripox, são vetores muito eficientes em mamíferos. Esses vírus não se replicam e a expressão de antígeno dura apenas cerca de 6 horas. Consequentemente, essas vacinas são muito seguras, não podem ser transmitidas por artrópodes e não são excretadas nos fluidos corporais. É interessante destacar que essas vacinas não estimulam imunidade ao vetor viral, uma característica que ocorre na utilização de outros vetores e que pode evitar imunizações subsequentes. As vacinas vetorizadas com canaripox parecem ultrapassar o bloqueio de anticorpos maternos e, assim, podem imunizar animais mais jovens. Elas não conseguem voltar a ser virulentas. Por isso, são amplamente utilizadas em doenças como a leucemia felina, o vírus do oeste do Nilo, a parvovirose canina, a cinomose, a influenza equina e a raiva. Outro exemplo de vacina viva recombinante é a vacina antirrábica vetorizada com vaccínia. O gene da glicoproteína do envelope do vírus da raiva, ou proteína G, pode ser inserido no vírus vaccínia. Essa glicoproteína pode induzir anticorpos neutralizantes contra o vírus e, assim, conferir proteção contra a doença. A infecção com o recombinante raiva-vaccínia leva à produção de anticorpos contra a proteína G e ao desenvolvimento da imunidade. Essa vacina foi eficaz quando administrada por via oral, na forma de iscas, a carnívoros silvestres. Essa forma de vacina pode ser distribuída em aviões. A vacina foi utilizada em Ontário, Canadá, para prevenir a disseminação da raiva em raposas, em Nova Jérsei, Estados Unidos, para prevenir a disseminação da raiva em guaxinins, e no Texas, também nos Estados Unidos, para bloquear a disseminação da raiva em coiotes. Desde 1995, por exemplo, 17,5 milhões de doses da vacina antirrábica vetorizada em vaccínia foram lançadas por via aérea ao longo de 661.745 km² do Texas, com grande sucesso (Quadro 24.1).

Vacinas altamente eficazes de categoria III foram desenvolvidas para a peste bovina; elas são compostas por vetor vaccínia ou capripox e os genes da hemaglutinina (*H*) ou de fusão (*F*) do vírus da peste bovina. Essas vacinas foram tão efetivas que seu uso sistemático levou à erradicação global da peste bovina. A vacina recombinante em capripox também protege os bovinos contra a dermatose nodular contagiosa. Outro exemplo de vacina da categoria III é a quimera do vírus da febre amarela para a proteção contra o vírus do oeste do Nilo. Essa tecnologia utiliza o capsídeo e genes não estruturais da cepa 17D da vacina atenuada contra a febre amarela para transportar genes de envelope de outros flavivírus, como o vírus do oeste do Nilo. O vírus resultante é uma quimera do vírus da febre amarela com o vírus do oeste do Nilo, muito menos neuroinvasivo e, consequentemente, muito mais seguro do que qualquer um dos vírus parentais. A margem de segurança pode aumentar ainda mais com a introdução de mutações pontuais nos genes de envelope. A primeira vacina da categoria III aprovada pelo Ministério da Agricultura dos Estados Unidos (United State Department of Agriculture, USDA) foi contra o vírus da doença de Newcastle.

QUADRO 24.1 Custo-Benefício da Vacinação

A raiva é uma doença cara. Quando um animal não vacinado morde uma pessoa, os custos incluem a vacinação pós-exposição da vítima e a quarentena ou a eutanásia do agressor. O cérebro do animal deve ser examinado para detecção do vírus. Esses custos, é claro, não consideram o estresse e a preocupação associados à doença. No Texas, Estados Unidos, a vacinação aérea com a vacina vetorizada antirrábica em iscas tem sido empregada para imunizar coiotes contra a raiva. Os custos totais do programa incluíram as despesas com vacinas, alimentos, aviões, combustível, e assim por diante. Os benefícios foram a economia associada à ausência de necessidade de profilaxia humana pós-exposição e exames para diagnóstico da raiva animal na área afetada. Calcula-se que o programa de vacinação contra a raiva tenha custado cerca de 26 milhões de dólares. Os benefícios foram estimados entre 89 e 346 milhões! Dependendo da frequência de profilaxia pós-exposição e exames em animais, a relação custo-benefício variou de 3,38 a 33,13.

Shwiff SA, Kirkpatrick KN, Sterner RT: Economic evaluation of an oral rabies vaccination program for control of a domestic dog-coyote rabies epizootic: 1995-2006, *J Am Vet Med Assoc* 233:1736-1741, 2008.

O vetor é um fowlpoxvírus submetido à incorporação dos genes *HA* e *F* do vírus da doença de Newcastle. Além disso, essa vacina tem a vantagem de conferir imunidade contra o fowlpoxvírus.

A vacinação oral é considerada, há muito tempo, a via desejável de administração a animais, mas foi prejudicada pela digestão e destruição dos antígenos pelo trato gastrointestinal. Essas vacinas foram administradas na forma de materiais vegetais. A clonagem de genes de antígenos virais vacinais em plantas foi realizada com sucesso na gastroenterite transmissível, no vírus de Norwalk e na doença de Newcastle. Entre as plantas utilizadas, estão tabaco, batata, soja, arroz e milho. Uma vacina da doença de Newcastle produzida em células de tabaco cultivadas em suspensão foi aprovada para uso nos Estados Unidos.

Em vez de administrar o antígeno em plantas, uma abordagem alternativa é o uso de células leveduriformes. As vacinas à base de leveduras apresentam altos níveis de expressão, são consideradas muito seguras, podem ser “autoadjuvantes”, e seus antígenos sofrem modificações adequadas pós-tradução. Muitas possíveis vacinas à base de leveduras estão em desenvolvimento, principalmente para imunização de aves e suínos.

Vacinas de Polinucleotídeos (Categoria IV)

Outro método de vacinação é a injeção não de um antígeno proteico, mas do DNA que codifica os antígenos vacinais. Esse DNA pode ser inserido em um plasmídeo bacteriano, uma sequência de DNA circular que atua como vetor (Fig. 24.8). O gene do antígeno vacinal é inserido sob o controle de uma forte sequência promotora mamífera. Injetado por via intramuscular, o plasmídeo geneticamente modificado é incorporado pelas células do hospedeiro. O DNA é, então, transcrito em RNA mensageiro e traduzido em uma proteína vacinal endógena (Fig. 24.9). O plasmídeo, ao contrário dos vetores virais, não pode se replicar em células mamíferas. A incorporação do plasmídeo é aumentada com o uso de alguns “adjuvantes”, como complexos lipídicos, microcápsulas e copolímeros não iônicos. O fosfato de alumínio parece bastante eficaz na melhoria da

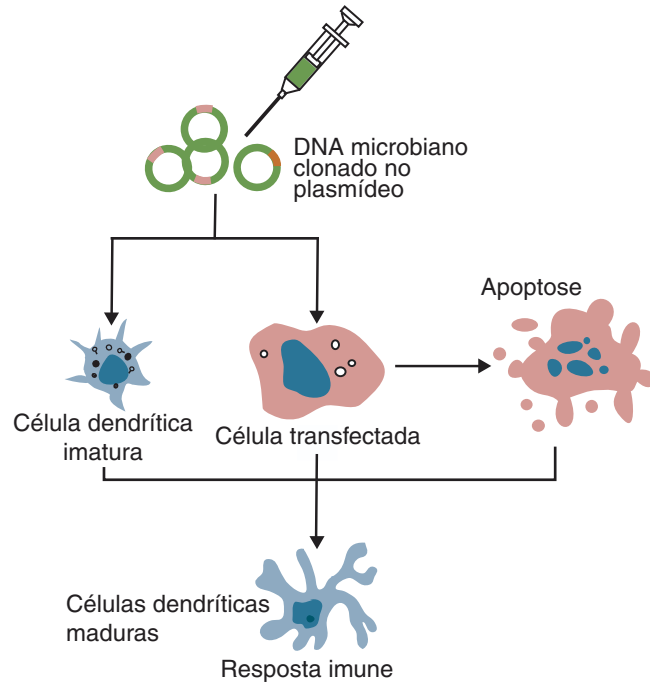


FIG. 24.8 O possível mecanismo de ação das vacinas de polinucleotídeos. O DNA que entra na célula é funcional e pode codificar antígenos endógenos.

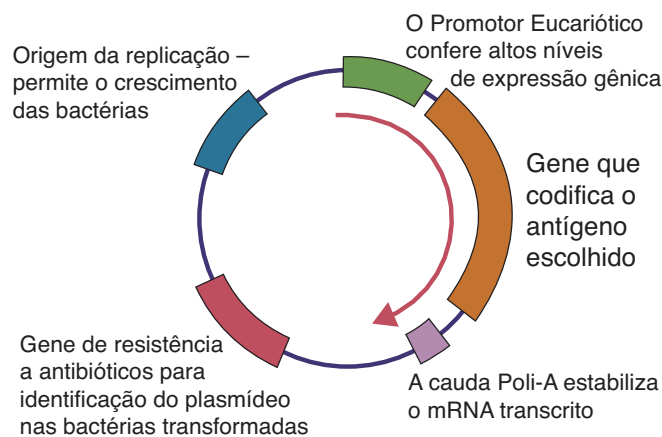


FIG. 24.9 A estrutura de um plasmídeo comum de DNA usado na vacinação. Neste caso, o plasmídeo codifica os antígenos protetores do vírus do Oeste do Nilo. Além de codificar o antígeno em questão, o plasmídeo carrega um marcador de resistência a antibióticos, o que permite seu rastreamento.

eficiência vacinal. As células transfectadas do hospedeiro processam a proteína vacinal e a apresentam, como um antígeno endógeno, associada a moléculas do MHC classe I. Isso leva ao desenvolvimento não apenas de anticorpos neutralizantes, mas também de linfócitos T citotóxicos, já que o antígeno é endógeno. Os antígenos expressos apresentam estruturas terciárias autênticas e modificações pós-tradução, como glicosilação. A resposta imune também é acentuada porque o DNA bacteriano contém motivos CpG não metilados que são reconhecidos pelo receptor do tipo *toll* 9 (TLR9) e ativam células dendríticas. Essa ativação, por sua vez, promove uma intensa resposta Th1.

Esse tipo de vacina é utilizado na proteção de equinos contra a infecção pelo vírus do oeste do Nilo. A vacina comercial

é composta por um vetor plasmídico elaborado para expressar altas concentrações de proteínas do envelope viral (E) e pré-membrana (prM). Além disso, o plasmídeo contém promotores e genes marcadores. Injetado com um adjuvante oleoso biodegradável, esse plasmídeo penetra nas células e faz com que expressem a proteína viral. Outras vacinas de DNA foram aprovadas para prevenir a necrose hematopoiética infecciosa em salmões do Atlântico e melanomas em cães (Capítulo 35). Essa estratégia também foi aplicada para a produção de vacinas experimentais contra a influenza aviária, a coriomeningite linfocítica, as raivas canina e felina, a parvovirose canina, a diarreia viral bovina, o vírus da imunodeficiência felina, o vírus da leucemia felina, a doença de Aujeszky, o vírus da febre aftosa, o herpes-vírus bovino 1 e a doença de Newcastle. Embora teoricamente produzam uma resposta semelhante à induzida pelas vacinas vivas atenuadas, essas vacinas de ácidos nucleicos são mais adequadas à proteção contra microrganismos de cultivo laboratorial difícil ou perigoso. Algumas vacinas de DNA podem induzir imunidade mesmo na presença de títulos bastante elevados de anticorpos maternos. Embora os anticorpos da mãe bloqueiem as respostas sorológicas, o desenvolvimento de uma forte resposta de memória não é comprometido.

As vacinas de polinucleotídeos devem entrar nas células-alvo. Isso pode ser conseguido por injeção intramuscular ou “disparo” de plasmídeos de DNA diretamente na pele, adsorvidos em esferas microscópicas de ouro lançadas por uma “pistola gênica” (*gene gun*). Embora a injeção intramuscular seja bastante ineficaz devido à baixa taxa de transfecção (cerca de 1% a 5% das miofibrilas adjacentes ao sítio de injeção intramuscular), a expressão pode persistir por pelo menos 2 meses. Os produtos gênicos são tratados como antígenos endógenos e apresentados na superfície celular ou secretados e apresentados para células processadoras de antígenos. Esse antígeno processado estimula preferencialmente uma resposta Th1, associada à produção de IFN- γ . O uso da pistola gênica é mais eficaz do que a injeção, pois uma parte do DNA é diretamente absorvida pelas células dendríticas, o que minimiza sua degradação. Ao não interagir com TLR9, o DNA estimula preferencialmente uma resposta Th2. O DNA viral em colírios pode induzir uma resposta de imunoglobulina da classe A (IgA) em lágrimas e na bile dos receptores.

A imunização com DNA purificado permite a apresentação de antígenos virais em sua forma nativa. Esses antígenos são sintetizados da mesma forma que os antígenos presentes em uma infecção viral. Isso é mais eficaz do que o uso de proteínas recombinantes, já que é difícil criar proteínas em conformação correta nos sistemas microbianos. Também é possível selecionar apenas os genes do antígeno de interesse em vez de utilizar um organismo carreador complexo, que possui cargas gênicas e massas antigênicas próprias e extensas.

Estratégias de Sensibilização e Reforço (*Prime-Boost*)

Há muito tempo é uma prática normal usar a mesma vacina na primeira imunização do animal e nos reforços da resposta imunológica. Essa abordagem tem diversas vantagens, como a simplicidade de fabricação e regulamentação da produção de vacinas. Entretanto, não há razão que impeça a utilização de diferentes formas de uma vacina na primeira imunização e nos reforços. Essa abordagem é conhecida como estratégia de sensibilização (*prime*) e reforço (*boost*). Em algumas circunstâncias, a técnica pode melhorar a eficácia vacinal de maneira

significativa. A abordagem de sensibilização e reforço é um tanto empírica e os pesquisadores podem simplesmente testar várias combinações de vacinas para determinar qual atinge os melhores resultados. A estratégia de sensibilização e reforço é amplamente investigada na tentativa de melhorar a eficácia das vacinas de DNA. As combinações em geral são a sensibilização com uma vacina de DNA e o reforço com outra vacina de DNA, talvez em outro vetor ou com antígenos proteicos recombinantes.

Vacinologia Reversa

Agora que muitos genomas microbianos completos são conhecidos, é possível identificar todas as proteínas de um patógeno por análise computacional. Essa análise pode ser utilizada para a seleção de potenciais epítomos protetores desse repertório. Isso pode levar à identificação de antígenos específicos ou desconhecidos, que podem ser experimentalmente testados, um processo chamado vacinologia reversa (Fig. 24.10). Nesse processo, os antígenos de interesse são sequenciados por completo e, em seguida, os epítomos importantes são identificados, sobretudo aqueles que se ligam a moléculas comuns de MHC e são reconhecidos por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Esses epítomos podem ser previstos por modelos informatizados da proteína ou pelo uso de anticorpos monoclonais para identificar componentes protetores essenciais. Uma vez identificados, os epítomos protetores podem ser sintetizados quimicamente e

testados em animais. Vacinas experimentais de linfócitos T foram desenvolvidas dessa forma contra o vírus da febre aftosa, o parvovírus canino e o vírus da influenza A.

ADJUVANTES

Uma prática comum para aumentar a eficácia de vacinas, sobretudo daquelas com microrganismos inativados ou antígenos altamente purificados, é a adição de substâncias chamadas adjuvantes (*adjuvare* é “ajudar” em latim). Os adjuvantes podem aumentar a velocidade ou magnitude da resposta do corpo às vacinas, permitir reduções na quantidade de antígeno injetado ou no número de doses administradas, direcionar a resposta da maneira adequada (Th1 ou Th2) e desencadear a imunidade celular, além de serem essenciais para o estabelecimento da memória prolongada contra antígenos solúveis. O uso de adjuvantes é fundamental para a eficácia de vacinas recombinantes ou de subunidades. Historicamente, a “ciência” dos adjuvantes é empírica. Em outras palavras, substâncias eram adicionadas às vacinas para ver se aumentavam a potência ou a duração da resposta imune. Por isso, os adjuvantes pareciam ser substâncias escolhidas de forma aleatória e seus mecanismos de ação eram especulações. Recentemente, porém, ficou claro que os adjuvantes mais empregados são ligantes de receptores do tipo *toll*. Seu principal modo de ação é a promoção da incorporação do antígeno, seu processamento e a apresentação por células dendríticas. De modo geral, os adjuvantes desencadeiam respostas imunes inatas que, por sua vez, agem sobre células dendríticas e aumentam a apresentação do antígeno a linfócitos T ou B (Tabela 24.3). Com o crescimento de nosso conhecimento sobre as interações entre células dendríticas e linfócitos T ou B, é possível desenvolver vacinas projetadas de modo a maximizar a apresentação do antígeno. Assim, o uso crescente de partículas revestidas por antígenos, citocinas e moléculas e coestimuladoras como as adjuvantes gerou melhorias encorajadoras na eficácia vacinal.

Sais de Alumínio

Esses sais são usados desde a década de 1920 e são, de longe, os adjuvantes mais comuns. Há diferentes formas de sais de alumínio, como gel de hidróxido de alumínio (na verdade, oxihidróxido de alumínio), gel de fosfato de alumínio, hidroxissulfato de alumínio e potássio (alúmen), além do fosfato de cálcio. Esses sais apresentam diferentes características físicas e propriedades adjuvantes.

Os sais de alumínio são adicionados às vacinas veterinárias há muitos anos com base na crença de que formam um depósito tecidual que libera o antígeno de maneira lenta e, assim, origina uma resposta imune potente e prolongada. Hoje, sabe-se que esse efeito de depósito não é necessário para a ação do adjuvante. As vacinas com adjuvantes de alumínio induzem a formação de nódulos inflamatórios no local de injeção. Esses nódulos contêm neutrófilos com alguns eosinófilos e linfócitos nas primeiras 48 horas. O recrutamento de células dendríticas mieloides maduras para os locais de injeção é estimulado. Da mesma maneira, os macrófagos ativados são atraídos para esses locais e podem se transformar em células dendríticas.

A remoção do nódulo do sítio de injeção e do depósito de alúmen associado já 2 horas após a vacinação não tem efeito significativo sobre as respostas imunes de linfócitos T ou B à vacina. O alúmen parece afetar os lipídios nas membranas plas-

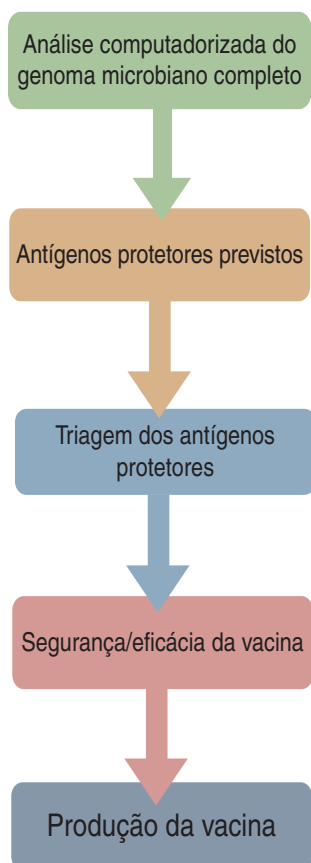


FIG. 24.10 A vacinologia reversa utiliza nosso grande conhecimento sobre o genoma de um microrganismo para prever a estrutura dos epítomos protetores. Esses epítomos podem ser sintetizados e, então, testados.

TABELA 24.3 Alguns Adjuvantes Comuns

Tipo	Adjuvante	Modo de Ação
Adjuvantes de depósito	Fosfato de alumínio	Depósito de liberação lenta do antígeno?
	Hidróxido de alumínio	Depósito de liberação lenta do antígeno?
	Alúmen	Ativação de DAMPs
	Adjuvante incompleto de Freund	Depósito de liberação lenta do antígeno
Adjuvantes microbianos	Corinebactérias anaeróbicas	Estimulador de macrófagos
	BCG	Estimulador de macrófagos
	Muramilo dipeptídeo	Estimulador de macrófagos
	<i>Bordetella pertussis</i>	Estimulador de linfócitos
	Lipopolissacarídeo	Estimulador de macrófagos
Estimuladores imunes	Saponina	Estimula o processamento de antígenos
	Lisolecitina	Estimula o processamento de antígenos
	Detergentes plurônicos	Estimula o processamento de antígenos
	Glucanas	Estimulador de macrófagos
	Dextran sulfato	Estimulador de macrófagos
Sistemas de liberação	Lipossomos	Estimula o processamento de antígenos
	ISCOMs	Estimula o processamento de antígenos
	Micropartículas	Estimula o processamento de antígenos
Adjuvantes mistos	Adjuvante completo de Freund	Depósito mais estimulação imune

BCG, Bacilo de Calmette-Guérin; DAMPs, padrões moleculares associados à lesão; ISCOMs, complexos imunoestimulantes.

máticas e promove o *homing* de células dendríticas (DC) para os linfonodos. Além disso, o alúmen mata células inflamatórias, como neutrófilos, o que provoca liberação do DNA e estimula as interações entre DC e linfócitos T (Fig. 24.11). Embora o alúmen seja o adjuvante mais usado em vacinas veterinárias, seus mecanismos de ação ainda não foram esclarecidos. Acreditava-se que ele promovia a liberação de IL-1, mas hoje se sabe que isso não acontece. O DNA se acumula nos locais de deposição de alúmen e, aparentemente, isso é importante, já que o tratamento com DNase bloqueia essa atividade adjuvante.

Os adjuvantes de alumínio influenciam apenas a resposta imune primária e têm pouco efeito sobre as respostas imunes secundárias. Eles também apresentam a desvantagem de, ao mesmo tempo que promovem respostas anticópias, terem

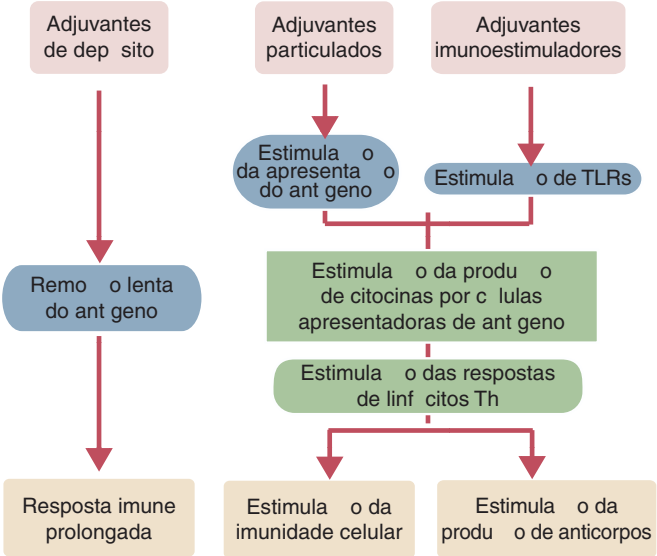


FIG. 24.11 Os três grupos principais de adjuvantes e as maneiras como eles estimulam as respostas imunes desencadeadas pelos antígenos da vacina.

pouco efeito sobre as respostas mediadas por células. Assim, o alúmen estimula respostas Th2 a antígenos proteicos e gera grandes números de linfócitos B. Porém, não é bom na geração de linfócitos Th1 CD8⁺.

Adjuvantes à Base de Saponina

As saponinas (glicosídeos triterpênicos), derivadas da casca da árvore quilaia (*Quillaja saponaria*), são muito usadas como adjuvantes. As saponinas brutas têm ações tóxicas e adjuvantes, embora seja possível purificar aquelas com atividade adjuvante potente e toxicidade mínima. As saponinas altamente purificadas são usadas em humanos. Os adjuvantes à base de saponina estimulam seletivamente a resposta Th1, pois direcionam antígenos às vias de processamento endógeno e estimulam a liberação de IFN-γ por células dendríticas. As saponinas ativam inflamassomos. A saponina também é utilizada como adjuvante nas vacinas contra a febre aftosa e na vacina recombinante contra a leucemia felina. Misturas tóxicas de saponina são utilizadas nas vacinas contra o antraz, onde destroem o tecido no local de injeção para que os esporos do antraz possam germinar. As micelas podem ser construídas com antígenos proteicos e uma mistura complexa de saponina, chamada Quil A. Os complexos imunoestimulantes (ISCOMs, do inglês *immune stimulating complexes*) são compostos estáveis à base de colesterol, fosfolipídios, saponina e antígeno. Os ISCOMs são adjuvantes eficazes, com poucos efeitos adversos. Os ISCOMs são altamente eficazes em direcionar antígenos às células apresentadoras profissionais, enquanto a saponina ativa essas células e promove a produção de citocinas e expressão de moléculas coestimuladoras. Dependendo do antígeno empregado, os ISCOMs podem estimular respostas Th1 ou Th2.

Emulsões de Água em Óleo

Um método de formação de um depósito de liberação lenta do antígeno é a sua incorporação em uma emulsão de água em óleo (gotículas de fase aquosa mais um surfactante, como Tween, Span ou lecitina emulsificada em fase oleosa). Um óleo mineral leve estimula a resposta inflamatória local crônica e,

por isso, há a formação de um granuloma ou abscesso ao redor do sítio de inoculação. O antígeno é lentamente removido da fase aquosa da emulsão. Esses adjuvantes de depósito podem causar irritação e destruição tissular significativas. Os óleos minerais são muito irritantes. Os óleos não minerais, embora menos irritantes, também são menos eficazes. Os danos teciduais induzidos pelos adjuvantes também podem promover a imunidade, já que os padrões moleculares associados à lesão (DAMPs) gerados pela inflamação e pela necrose celular estimulam células dendríticas e macrófagos. Os adjuvantes com atividade irritante significativa não são, porém, aceitáveis nas vacinas modernas, e é essencial reduzir esse efeito, mas reter a eficácia da molécula. Em seres humanos, as emulsões de óleo em água à base de esqualeno foram aprovadas como adjuvantes vacinais. (O esqualeno é um óleo de triterpeno.) São mais potentes do que o alúmen, mas podem induzir reações locais brandas ao desencadear a liberação local de TNF- α e IL-1 β ; no entanto, seu mecanismo de ação ainda não foi esclarecido.

Adjuvantes Particulados

O sistema imune pode capturar e processar partículas como bactérias e outros microrganismos de forma muito mais eficiente do que antígenos solúveis. Desse modo, adjuvantes bem-sucedidos são aqueles que podem incorporar os antígenos em partículas facilmente fagocitadas (Fig. 24.12). Entre esses adjuvantes estão emulsões, micropartículas, ISCOMs e lipossomos, todos projetados para transporte eficiente do antígeno até suas células apresentadoras. Em geral, as partículas têm tamanho semelhante ao de bactérias e são rapidamente endocitadas. Os lipossomos são micropartículas sintéticas de base lipídica e 200 a 1.000 nm de tamanho que contêm antígenos encapsulados; esses antígenos são capturados e processados de forma eficaz ao mesmo tempo que estão protegidos da degradação rápida. Os ISCOMs, já descritos, são micropartículas complexas de base lipídica com cerca de 40 nm de tamanho. Todos esses adjuvantes particulados podem ficar mais potentes pela incorporação de imunoestimuladores microbianos. Eles ainda não são amplamente utilizados em vacinas veterinárias.

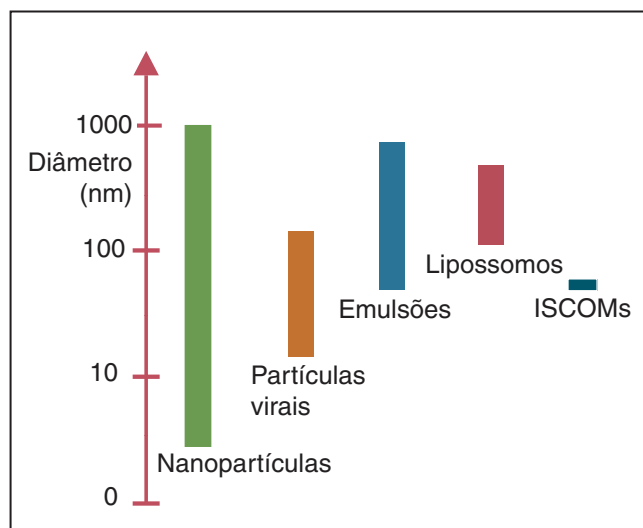


FIG. 24.12 As nanopartículas podem ser de diferentes tamanhos e isso influencia muito a natureza das respostas imunes às vacinas.

É importante notar, porém, que o tamanho das partículas é essencial. Assim, os adjuvantes convencionais de alumínio empregam micropartículas (com 2 a 8 μ m de tamanho) e promovem respostas Th2. Contudo, se forem reduzidos a nanopartículas (com 200 a 1.500 nm), favorecem respostas Th1. Os adjuvantes de nanopartículas são muito promissores nas vacinas de nova geração. Esses adjuvantes podem ser feitos com diversos compostos, como poliaminoácidos, polissacarídeos, poliestireno e polímeros biodegradáveis, além de elementos não degradáveis, como ouro, prata, ferro e sílica. Os adjuvantes de nanopartículas podem ser projetados para apresentar uma mistura de antígenos e moléculas coestimuladoras em sua superfície para otimizar a resposta imune.

As nanopartículas apresentam propriedades imunológicas especiais que podem ser manipuladas pela alteração de seu tamanho, formato, carga e hidrofobicidade. Essas nanopartículas podem ser revestidas com combinações de antígenos, citocinas, moléculas de adesão, imunomoduladores e ligantes coestimuladores e, na verdade, podem ser especificamente projetadas para gerar processos protetores essenciais. Ao associar antígenos a receptores de reconhecimento de padrão, como receptores do tipo NOD (NLRs) e TLRs, as nanopartículas podem desencadear respostas de linfócitos citotóxicos a antígenos que normalmente não o fazem. A administração intradérmica e a intramuscular podem induzir respostas imunes potentes, enquanto a administração intravenosa pode induzir tolerância.

As partículas semelhantes a vírus (VLPs, do inglês *virus-like particles*) são nanopartículas com 20 a 100 nm de tamanho. As VLPs podem ser criadas com subunidades de proteínas virais, formando, assim, um capsídeo viral. Ou também podem ser totalmente sintéticas, produzidas com subunidades projetadas com cuidado. As VLPs, embora semelhantes a vírus, não contêm material genético e não podem se replicar; assim, são muito mais seguras do que as vacinas virais convencionais. Outras moléculas podem ser incorporadas nas VLPs, como ligantes de TLR ou outras moléculas que têm células como seus alvos. As VLPs e as demais nanopartículas são pequenas o suficiente para penetrarem as barreiras teciduais, trafegarem até os linfonodos drenantes e serem incorporadas por células apresentadoras de antígeno. Especialmente quando conjugadas a moléculas específicas direcionadas a células, as nanopartículas são muito mais eficazes do que as micropartículas em sua incorporação por células do sistema imune. As nanopartículas promovem a ativação de DC e a apresentação de antígenos em MHC de classe I e classe II. Por isso, podem estimular linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺.

Adjuvantes Imunoestimuladores

Os adjuvantes imunoestimuladores promovem a produção de citocinas. Muitos desses adjuvantes são produtos microbianos complexos projetados para terem como alvo receptores de reconhecimento de padrão (PRRs). Consequentemente, ativam células dendríticas e macrófagos e estimulam a produção de citocinas importantes, como IL-1 e IL-12. Essas citocinas, por sua vez, promovem respostas mediadas por linfócitos T auxiliares e direcionam as respostas imunes adaptativas. Dependendo do produto microbiano específico, podem aumentar as respostas Th1 ou Th2. Ligantes de TLR, sozinhos, normalmente não são adjuvantes eficazes, pois induzem inflamação excessiva. De fato, a maior dificuldade encontrada no desenvolvimento de

adjuvantes é estimular a imunidade adaptativa sem provocar imunidade inata excessiva.

p0455 O RNA de fita dupla (dsRNA) é o ligante de TLR3, e o dsRNA sintético (por exemplo, poliIC) é um adjuvante eficaz. Os ligantes de TLR4, como o lipopolissacarídeo bacteriano (ou derivados), são há muito tempo conhecidos por sua atividade adjuvante. Sua toxicidade, porém, limita seu uso. Os lipopolissacarídeos aumentam a produção de anticorpos se administrados ao mesmo tempo que o antígeno. Não atuam sobre a resposta imune celular, mas podem romper a tolerância de linfócitos T e apresentam atividade imunoestimuladora geral. Corinebactérias anaeróbias inativadas, principalmente *Propionibacterium acnes*, têm efeito semelhante. Utilizadas como adjuvantes, essas bactérias estimulam a atividade antibacteriana e antitumoral. A flagelina bacteriana, ligante de TLR5, é um adjuvante que promove respostas mistas Th1 e Th2. O ligante de TLR7 e TLR8 é o RNA de fita simples. Infelizmente, o RNA de fita simples se degrada logo e, portanto, não pode ser empregado. Alguns ligantes sintéticos, como imidazoquinolinas e alguns análogos de guanosina e adenosina, podem ser bons adjuvantes. Os oligonucleotídeos CpG não metilados que se ligam a TLR9 são adjuvantes imunoestimuladores potentes para respostas Th1. Existem várias classes de oligonucleotídeos CpG, cada um com efeitos imunoestimuladores ligeiramente diferentes. Na prática, verificou-se que múltiplos estímulos inatos podem ser mais eficazes do que um único estímulo e que combinações de adjuvantes com múltiplos mecanismos de ação parecem ser mais eficazes.

Adjuvantes Combinados

Adjuvantes bastante eficazes podem ser construídos pela combinação de um adjuvante de depósito ou particulado com um agente imunoestimulador. Um adjuvante de depósito de base oleosa, por exemplo, pode ser misturado à *Mycobacterium tuberculosis* inativada e incorporada à emulsão de água em óleo. A mistura é chamada de adjuvante completo de Freund (FCA). O FCA forma um depósito e os bacilos apresentam muramyl dipeptídeo (*N*-acetilmuramyl-alanil-d-isoglutamina), uma molécula que ativa macrófagos e células dendríticas por meio de NOD2. O FCA funciona melhor quando administrado por via subcutânea ou intradérmica e quando a dose de antígeno é relativamente baixa. O FCA favorece a produção de IgG em relação à IgM. Inibe a indução de tolerância, favorece as reações de hipersensibilidade tardia, acelera a rejeição de enxertos e promove a resistência a tumores. O FCA pode ser utilizado na indução experimental de doenças autoimunes, como a encefalite alérgica experimental e a tireoidite (Capítulo 37). Além disso, estimula a ativação de células M1, promovendo suas atividades fagocíticas e citotóxicas.

O uso de adjuvantes de base oleosa em animais destinados ao consumo humano é problemático, pois o óleo pode prejudicar a carne. O uso do FCA é inaceitável em bovinos, não apenas por causa do óleo mineral, mas também porque as micobactérias podem induzir resultado positivo no teste cutâneo de tuberculina. O FCA é altamente tóxico em cães e gatos.