

## **BMM 160 – Microbiologia Básica para Farmácia**

**Prof. Armando Ventura**

### **Apostila de Virologia**

#### **Noções de Imunologia e Vacinas Virais**

##### **- As primeiras vacinas e a erradicação da varíola**

A varíola é uma doença de evolução rápida, após duas semanas de incubação começam os sintomas, culminando com as pústulas na pele, e em 30% dos casos (varíola major) evolução para hemorragia grave e morte. O primeiro método de imunização foi desenvolvido contra a varíola aproximadamente 1000 aC na China. A técnica chamada de variolação consistia em secar o material colhido das pústulas ao sol e esfregá-lo, fazendo escarificações com objeto pontiagudo na pele de pessoas que viviam em regiões ameaçadas pela epidemia.

Apesar de ser observada uma diminuição dos casos, esse é um procedimento de altíssimo risco pois os vírus contidos no material pustular nem sempre ficavam inativados, levando à doença. No entanto essa prática espalhou-se pelo mundo e por ironia do destino Edward Jenner, quando criança, contraiu a infecção após uma variolação. Felizmente Jenner sobreviveu, tornou-se médico, e teve sua atenção voltada para a resistência à doença, apresentada por ordenhadoras portadoras de lesões similares à varíola presentes em bovinos (*cowpox*). Em 1796 fez um experimento, utilizando como cobaia o menino James Phipps, que após variolação com as lesões de *cowpox* resistiu ao desafio com a varíola. Esse novo procedimento mostrou-se seguro e efetivo, dando início à era das vacinas, sem o conhecimento do agente infeccioso, o vírus da varíola.

Vacina é um termo derivado do latim, *vacca* (vaca) e *vaccina* (vindo da vaca), consolidado por Pasteur em referência ao trabalho de Jenner, no qual se baseou para desenvolver uma vacina de caráter experimental contra a bactéria *Pasteurella multocida*, letal para galinhas (1879). A vacina baseou-se na atenuação da bactéria.

Louis Pasteur e Émile Roux posteriormente desenvolveram a vacina contra a Raiva (uma doença 100% letal), a segunda vacina antiviral da história, produzida em tecido nervoso de coelhos e inativada por secagem. Foi testada pela primeira vez em humanos no garoto Joseph Meister mordido por um cão raivoso, em 1885.

Ao serem descobertos os vírus, o nome científico do “cowpox virus” ficou sendo *variolae vaccinae*. O cultivo desse vírus em larga escala, no dorso de bezerras, foi iniciado em 1805. Em algum momento em meados desse século o vírus *vaccinia* substituiu o cowpox nesse processo de cultivo. A vacinação massiva passou a ser aplicada com a perspectiva de obter uma “imunidade de rebanho” em toda a população.



### Áreas endêmicas de varíola em 1945

A partir de 1966 a OMS lançou a nível mundial um programa de contenção para erradicar a varíola, tendo como base o seguinte:

- Ser humano é o único hospedeiro do vírus.
- Diagnóstico eficiente.
- Uma intervenção efetiva para interromper a transmissão era possível.
- Formulação vacinal liofilizada.
- Sistema de inoculação eficiente.
- A identificação dos casos, e a contenção da transmissão vacinando os contatos primários e seus contatos mostrou-se uma **estratégia eficiente** (esquema abaixo).



O paciente Ali Maow Maalin foi último caso registrado de varíola, em 1977 na Somália. No entanto, o vírus continua preservado em freezers nos EUA e Rússia, devido à sua potencial utilização como arma biológica.

Fica a perspectiva de se conseguiremos repetir a proeza da erradicação para outros vírus. Tentamos erradicar a Poliomielite e o Sarampo mas, até o momento, falhamos.

Porque uma vacina é eficiente na prevenção de doenças causadas por microrganismos? As respostas começaram a vir com o desenvolvimento da Imunologia.

## - Noções de Imunologia

O conteúdo aqui apresentado tem por objetivo apenas possibilitar um melhor entendimento da interação dos vírus com os hospedeiros humanos. Uma abordagem mais aprofundada será feita na disciplina de Imunologia para Farmácia.

### - Definições

**Imunologia** é o estudo do sistema imune e dos mecanismos que os seres humanos e outros animais usam para defender seus corpos da invasão de microrganismos

**Imunidade** é a resistência a infecções (do latim *immunis*).

O **sistema imune** é o conjunto de células, tecidos e moléculas que mediam essa resistência.

A **resposta imune** é a reação coordenada dos componentes do sistema imune.

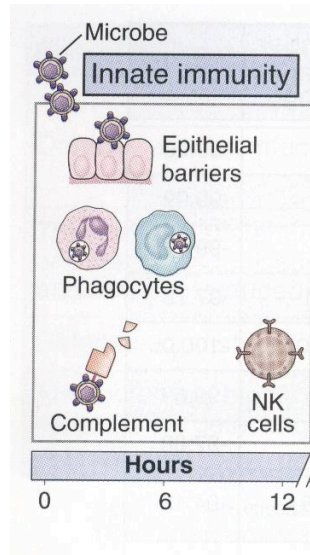
O sistema imune se baseia no reconhecimento do próprio e do não-próprio (*self x non-self*). Este reconhecimento é observado nos mais variados organismos é uma marca evolutiva antiga, estando já presente, por exemplo, nas primitivas colônias de esponjas. O sistema imune é essencial à vida: a falta ou deficiência dele levam à doença ou morte.

Os invasores (*non-self*), no caso dos seres humanos, podem ser exemplificados por microorganismos que provocam doenças altamente prevalentes, como: a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* presente em 33% da população, o protozoário *Toxoplasma gondii* presente em 75% da população, e o Vírus Epstein-Barr (EBV) presente em 80% da população.

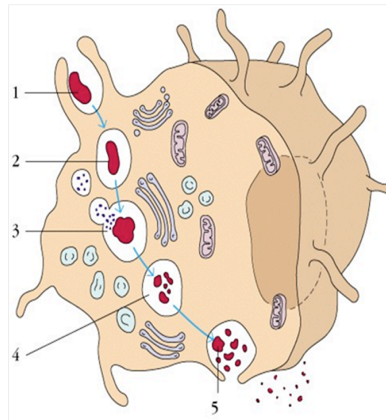
**Imunidade inata** (natural ou nativa) é a defesa presente em indivíduos saudáveis, desde o nascimento e preparada para bloquear a entrada de micróbios e eliminar os que foram bem sucedidos na invasão de tecidos. **Imunidade adaptativa** (específica ou adquirida) é a defesa estimulada por micróbios que invadem tecidos, i.e., adapta-se para contrapor a presença desses invasores microbianos.

### **Imunidade inata**

A imunidade inata tem vários componentes (Fig 1). As barreiras epiteliais, o muco, o suco gástrico, a lisozima presente na saliva e lágrimas, e a microbiota normal são obstáculos mais diretos à invasão. Se micróbios quebram essas barreiras e entram nos tecidos ou circulação, outros componentes entram em ação, como as células *Natural Killer* (NK), os fagócitos como os macrófagos, as proteínas do plasma, e o sistema complemento.

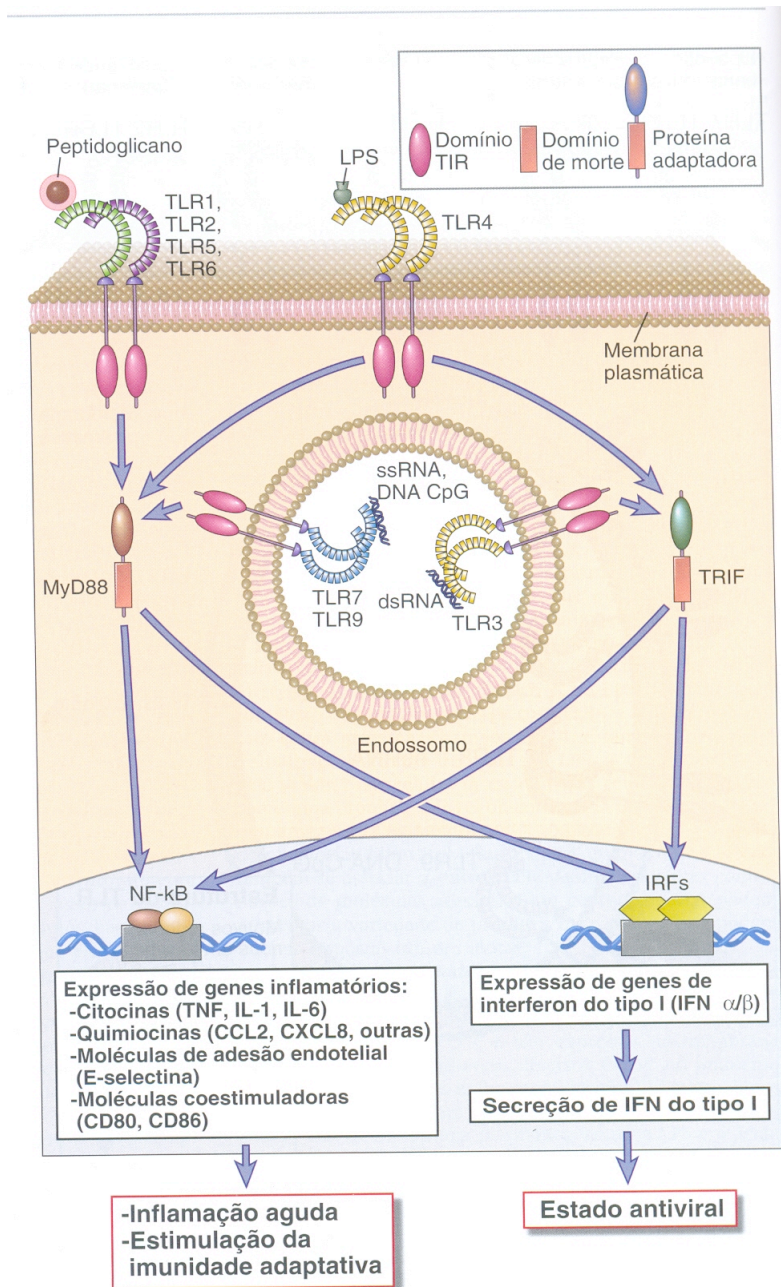


## Fagocitose



**Fig 1**

No caso dos vírus, é de especial interesse a indução do “estado antiviral”, pelos interferons do tipo I (IFNs alfa e beta). Essa resposta começa pelo reconhecimento de padrões estranhos por parte das células, através de vários receptores TLR (toll like receptors). Os TLRs são proteínas transmembrânicas posicionadas nas membranas citoplasmática ou endossomal, capazes de ligar estruturas de patógenos, como os ácidos nucleicos virais (RNA dupla fita), conforme esquematizado à figura 2. Mediante essa ligação um sinal é transmitido levando à transcrição e produção dos IFNs do tipo I, que irão induzir o estado antiviral. É importante notar que essas mesmas vias de transdução de sinal podem levar à liberação de citocinas e outras moléculas, induzindo inflamação ou estímulo da resposta imune adaptativa, mostrando uma conexão dos dois ramos da imunidade em resposta aos microrganismos.



**Fig 2**

O estado antiviral (figura 3) é então induzido na própria célula e/ou células vizinhas, através da ligação de IFNs liberados aos seus receptores. Três consequências principais ocorrem. Uma proteína quinase é autofosforilada na presença de RNAdf, e fosforila o fator de alongação eIF-2 inibindo a síntese proteica viral. RNAdf ativa 2'5'Oligo A sintetase que converte ATP no polímero 2'5' Oligo A (contem 2'- 5'fosfodiester) que ativa RNase L, que degrada o RNAviral. As proteínas Mx pertencentes à família das dinaminas interagem com os nucleocapsídeos bloqueando transcrição e replicação virais.

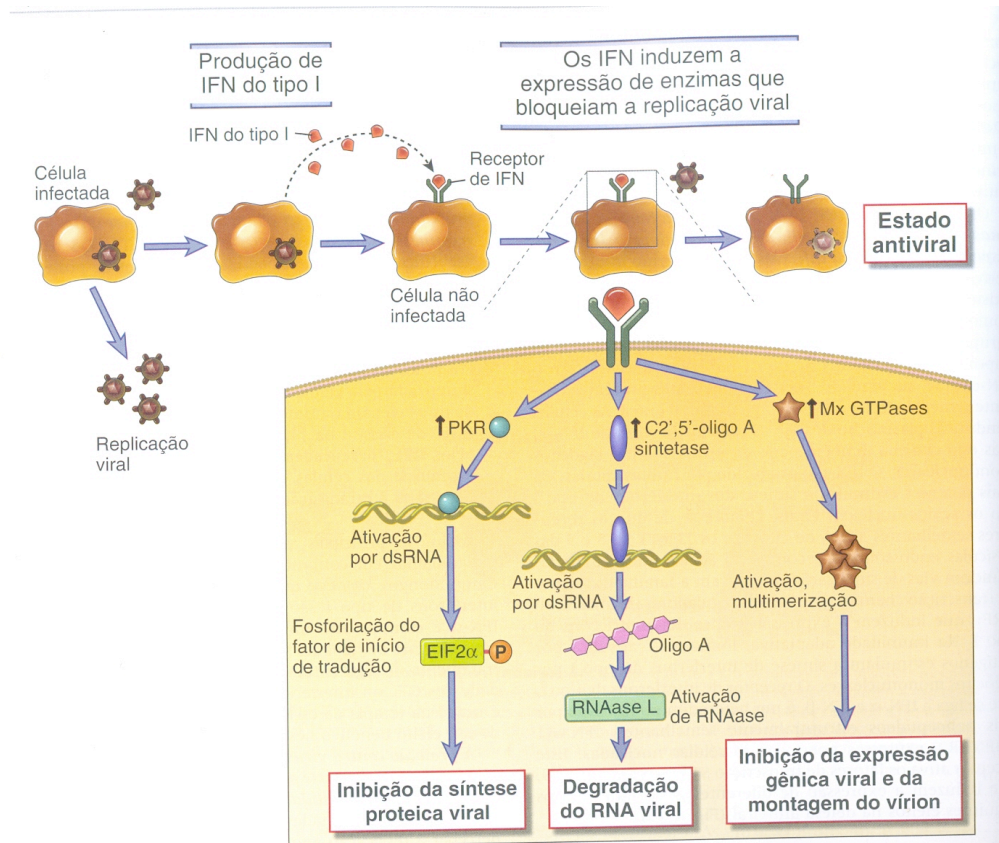


Fig 3

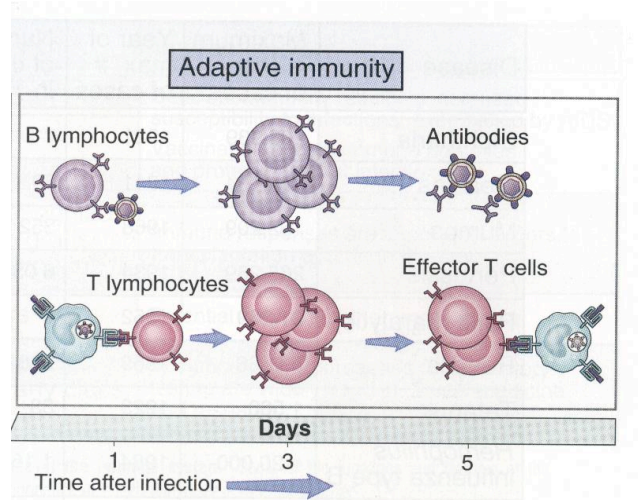
## Imunidade Adaptativa

Os componentes do sistema imune responsáveis pela imunidade adaptativa consistem de linfócitos e os seus produtos, anticorpos e citocinas (ou linfocinas). Os anticorpos reconhecem substâncias diferentes, microbianas ou não, que são chamadas **antígenos**. Os antígenos são ativos somente se atravessam as barreiras inatas e podem ser reconhecidos. Nesse processo geram mecanismos que são especializados para combater tipos diferentes de infecções.

Os anticorpos produzidos pelos linfócitos B combatem micróbios no fluido extra-celular, e os linfócitos T ativados micróbios intra-celulares (Fig 4).

Tipos de resposta imune adaptativa:

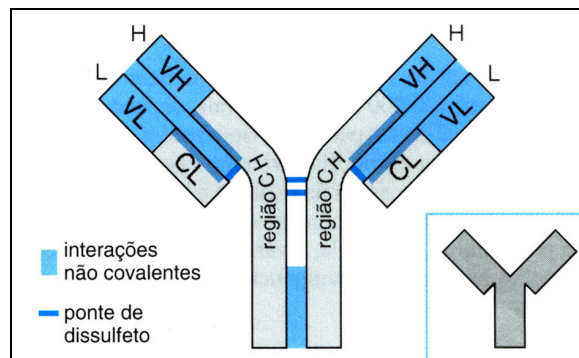
- Humoral – anticorpos produzidos por Linfócitos B, destinados à defesa extra-celular.
- Celular – diversas células e moléculas, destinados à defesa intra-celular.



**Fig 4**

### ***Imunidade Humoral***

Os anticorpos produzidos por linfócitos B são secretados na circulação e mucosas. Neutralizam e eliminam micróbios e toxinas microbianas no sangue e no lúmen de órgãos mucosos (Fig 5). Nestes têm como função impedir que micróbios presentes na mucosa ganhem acesso para colonizar células e tecidos, prevenindo o estabelecimento de infecções. Quatro cadeias proteicas (duas leves, L, e duas pesadas, H), unem-se por pontes dissulfeto e interações não-covalentes, gerando dois domínios variáveis equivalentes (VH+VL) (Fig 5). Esses domínios, únicos em cada anticorpo, têm a propriedade de ligar-se especificamente a um trecho (epítipo) do antígeno (ex: uma glicoproteína do envelope viral).



**Fig 5.**

### ***Imunidade Celular***

Anticorpos não têm acesso a microrganismos que vivem e se dividem dentro de células infectadas. A defesa contra tais microrganismos é chamada imunidade celular e é mediada por linfócitos T. Os linfócitos T auxiliares (*helper*,  $T_H$ ) ativam fagócitos para destruir microrganismos, além de ativar os linfócitos T citotóxicos ( $T_C$ , CTL) para matar células que estão abrigando microrganismos infecciosos no citoplasma (Fig 4). Cabe destacar que os linfócitos T auxiliares, também estimulam os linfócitos B a produzir anticorpos, e que essas

funções são mediadas pela secreção de citocinas. Essas células, portanto, são fundamentais na coordenação da resposta imune adaptativa.

### **Imunidade Adquirida pode ser Ativa ou Passiva**

Imunidade pode ser induzida em um indivíduo por infecção ou vacinação (imunidade ativa), ou conferida a um indivíduo por transferência de anticorpos ou linfócitos de um indivíduo ativamente imunizado (imunidade passiva).

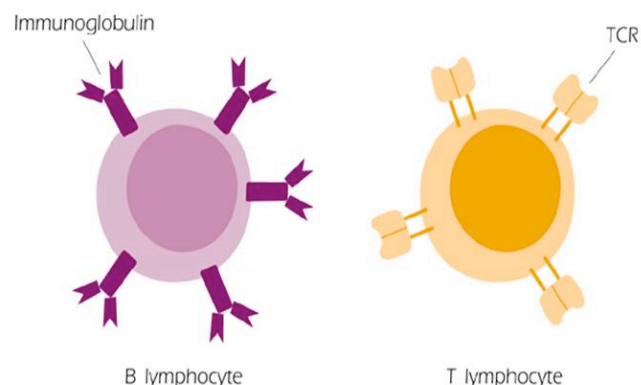
Na imunização passiva, um indivíduo “virgem” recipiente de células ou anticorpos contra um agente infeccioso, combate a infecção por ele causada. A imunidade passiva é útil para conferir imunidade rapidamente, mesmo antes de montar uma resposta ativa. Não induz resistência duradoura à infecção. Pode ser natural, como na transferência de anticorpos maternos (leite e placenta), ou não natural com nos tratamentos médicos com soro hiperimune (ex: soros antiofídico e antirrábico).

### **Propriedades da Resposta Imune Adaptativa**

As propriedades da resposta imune adaptativa são: Especificidade; Discriminação entre o próprio e o não-próprio; e Memória.

A **especificidade** só é possível devido à capacidade que o sistema imune tem para diferenciar entre um grande número de antígenos. Avalia-se um potencial para distinguir 100 milhões de antígenos, ou epítomos, diferentes. A base molecular dessa variabilidade está no processo de recombinação dos genes das cadeias leve e pesada das imunoglobulinas, durante o processo de diferenciação dos clones de linfócitos B. A exposição anterior a um antígeno não modifica a resposta para outro. Essa especificidade é devida a cada linfócito que se diferencia, portanto com tantas alternativas quanto o “repertório de linfócitos”.

A **discriminação entre o próprio e o não-próprio** passa pelas propriedades e estrutura dos **receptores de linfócitos (TCR)**, que são moléculas da família das imunoglobulinas (Fig 6). Como os anticorpos, os genes dos TCRs têm um mecanismo recombinacional, com potencial para gerar moléculas que também reconhecem uma enorme variedade de epítomos.



**Fig 6**

**Memória imunológica** é a capacidade de recordar um contato prévio com uma molécula e responder a este novo contato de forma mais rápida e ampla. A memória imunológica



aperfeiçoa a habilidade do sistema imune para combater infecções persistentes e recorrentes, ativa células de memória previamente geradas, e a cada encontro gera mais células de memória. Essas são as razões porque vacinas e/ou infecções conferem proteção longa e duradoura. Podemos dizer que as fases da resposta imune são: Reconhecimento do antígeno; Ativação de linfócitos; Eliminação do antígeno; Declínio; e Memória (Fig 7).

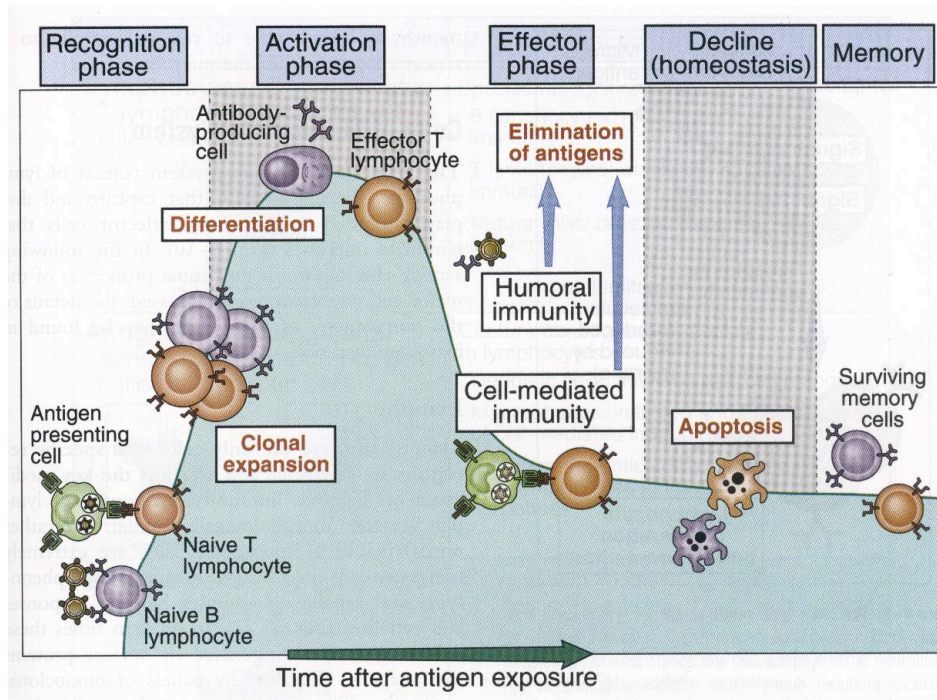


Fig 7

### - Desenvolvimento das vacinas contra a Poliomielite

Na família dos **Picornavírus** (pico=pequeno, ou seja, pequenos vírus com genoma de RNA), temos três grupos de maior interesse.

**Enterovírus** infectam o trato entérico e causam de meningites, paralisias, diarreias, e outras sintomatologias, e são mais de 70 espécies, aonde se encontram os vírus da Poliomielite, Coxsackie A e B, e Echovírus.

**Rinovírus** infectam o trato respiratório e são causa muito frequente de resfriados, são mais de 100 sorotipos. Não resistem ao pH ácido do estômago, restringindo-se à orofaringe.

**Hepatovírus** infectam o trato entérico, órgão alvo final o fígado, vírus da hepatite A.

Os picornavírus não possuem envelope, seu capsídeo é de simetria icosaédrica com 27 nm, e o genoma de RNA positivo tem em média 7.500 bases. A estrutura desses vírus é muito estudada, sendo o capsídeo constituído pelas proteínas VP1 a VP4, que se unem para formar os capsômeros visíveis à microscopia eletrônica (Fig 8), sendo a proteína VP4 posicionada internamente e importante para a estabilização do RNA.

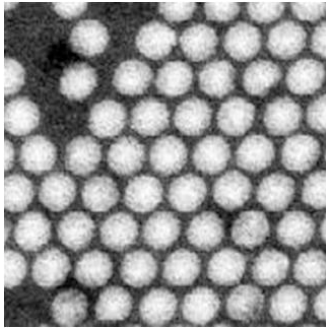


Fig 8.



Fig 9

O vírus da poliomielite, causador da paralisia infantil, era um gravíssimo problema até o final da década de 1950 (Fig 9).

### Patogenia

Existem três tipos de **poliovírus (pólios 1, 2 e 3)**, para os quais se encontram receptores apenas em células de primatas. Esses vírus apresentam, portanto, uma gama de hospedeiros restrita. Dessa forma, as células de origem humana ou de macacos, são as de escolha para o cultivo dos poliovírus em laboratório, a partir de amostras de fezes ou “swabs” de garganta ou reto.

A patogenia provocada pelos poliovírus tem seu início quando o vírus entra pela boca, a **porta de entrada** no organismo. A replicação primária ocorre nos epitélios da faringe e intestinos, sendo que permanecem detectáveis por algumas semanas. Depois de se multiplicarem novamente em gânglios linfáticos em dois a cinco dias, ocorre o aparecimento de vírus no sangue (**viremia**). Em torno de cinco dias após o início da infecção aparecem os primeiros anticorpos, quando o vírus já está instalado nos axônios dos nervos periféricos e começa sua migração para o sistema nervoso central, aonde pode afetar principalmente os neurônios motores inferiores. Assim as manifestações clínicas, depois desse período de incubação de aproximadamente 14 dias, podem ir da poliomielite abortiva (recuperação total, 5% dos casos), passando pela poliomielite não parálitica (com um quadro de meningite asséptica, 1-2% dos casos), e podendo chegar à poliomielite parálitica (0,1-2% dos casos). O tratamento é feito com analgésicos, manutenção da respiração e hidratação, além de fisioterapia. A imunidade adquirida após a infecção é permanente e tipo-específica.

A distribuição dos poliovírus é mundial, sendo as crianças mais suscetíveis, a maioria dos casos ocorre até os cinco anos, e os picos de ocorrência são no verão e outono. A intensidade dessa ocorrência está ligada às condições sanitárias inadequadas, visto que em torno de 90% dos casos são assintomáticos e a liberação dos vírus nas fezes pode estender-se por até mais de 30 dias. A prevenção começa, portanto, pela melhoria dessas condições.

### Prevenção

Em termos de prevenção da poliomielite, o quadro começou a mudar radicalmente quando em meados da década de 50 após o estabelecimento das culturas celulares em larga escala, foi possível obter grandes quantidades de vírus. A primeira vacina aprovada foi a

inativada por formol, desenvolvida pelo grupo de Jonas Salk. Por volta de cinco anos mais tarde, Albert Sabin introduziu a utilização da vacina com vírus vivos atenuados, que por apresentar várias vantagens passou a ser a mais utilizada. As duas formulações contêm os três sorotipos, que no caso da vacina de Sabin são capazes de se multiplicar no epitélio intestinal sem causar doença. Destacam-se dentre as vantagens da vacina atenuada o fato de induzir a produção de anticorpos do tipo IgA que dão proteção ao nível das mucosa, além de proporcionar uma maior duração da imunidade como um todo. Outros pontos positivos são a facilidade de administração e o fato de que os vírus vacinais podem se espalhar na comunidade, aumentando o efeito de imunização. Uma desvantagem, entretanto é que durante a multiplicação pode haver reversão do fenótipo (apesar disso ocorrer muito raramente), levando o vírus vacinal a causar doença. Isto pode ser especialmente prejudicial em indivíduos imunodeprimidos, sendo nesses casos recomendada a vacina inativada. Outro ponto negativo da vacina atenuada é de que quando há outros enterovírus, infectando naturalmente o indivíduo no momento da administração, estes interferem impedindo a multiplicação do vírus vacinal. Na tabela abaixo temos uma comparação entre a vacina de Salk e a de Sabin.

| <b>Característica</b>  | <b>Inativada (Salk)</b> | <b>Atenuada (Sabin)</b> |
|--|-------------------------|-------------------------|
| Previne a doença   | Sim                     | Sim                     |
| Induz IgG humoral  | Sim                     | Sim                     |
| Induz IgA ao nível intestinal                                  | Não                     | Sim                     |
| Permite uma proteção secundária pela disseminação à comunidade | Não                     | Sim                     |
| Interfere na replicação do vírus selvagem no intestino         | Não                     | Sim                     |
| Reverte à virulência   | Não                     | Sim (raramente)         |
| Co-infecção com outros enterovírus compromete a imunização     | Não                     | Sim                     |
| Pode causar doença em indivíduos imunocomprometidos            | Não                     | Sim                     |
| Via de administração   | Injetável               | Oral                    |
| Requer refrigeração  | Não                     | Sim                     |
| Duração da imunidade   | Mais curta              | Mais longa              |

### **- Vacinas virais**

Conforme comentado acima, em Noções de Imunologia, quando o organismo está sendo invadido por um vírus, temos um conjunto de **defesas inespecíficas** que entram em ação: produção de interferons, fagocitose, febre e limpeza mucociliar. De especial interesse em virologia é a indução dos interferons que podem fazer com que a célula adquira um estado antiviral, bloqueando a síntese de proteínas virais ou levando à degradação dos RNAs virais. As defesas efetivas, no entanto, são as **específicas, imunidade passiva e imunidade ativa**.

Para a prevenção de infecções virais podemos utilizar o princípio de imunidade passiva, administrando imunoglobulinas extraídas do sangue. Um procedimento clássico é a administração do soro anti-rábico obtido de sangue humano ou animal. Outros exemplos estão na tabela a seguir.

| <b>Imunoglobulina</b>                                  | <b>Vírus</b>  |
|--|---|
| Humana normal  | Sarampo em indivíduos imunocomprometidos<br>Para prevenção da hepatite A      |
| Humana para Hepatite B                                 | Após acidentes de risco (agulhas...),<br>junto com a vacina contra hepatite B |
| Humana ou animal para<br>Vírus da Raiva                | Proteger até que a vacina induza<br>imunidade                                 |
| Humana para Herpes Zóster                              | Evitar a multiplicação do Herpes Zoster<br>em imunossuprimidos                |
| Plasma de convalescentes<br>de Febre de Lassa ou Ebola | Tentativa de evitar a progressão da<br>patologia em indivíduos infectados     |

A imunidade ativa, estimulada pelas vacinas, compõe-se das imunidades humoral e celular, conforme comentado em Noções de Imunologia. O combate aos patógenos intracelulares, como é o caso dos vírus, tem na imunidade celular a componente mais importante, sendo que boa parte das doenças virais não são debeladas quando há presença apenas de anticorpos no soro. Como vimos no caso das vacinas contra a poliomielite, o tipo de vacina pode determinar respostas mais apropriadas, que dependerão da interação de cada vírus com o hospedeiro.

O controle dos vírus animais pela imunização pode ser dividido em várias gerações dependendo do método de obtenção dos antígenos. Esses métodos foram inicialmente baseados no cultivo em animais, passando aos ovos embrionados, culturas celulares e finalmente pela utilização da tecnologia do DNA recombinante. Na tabela abaixo, temos um resumo dessa evolução.

| <b>1ª geração<br/>animais</b> | <b>2ª geração<br/>ovos embrionados</b> | <b>3ª geração<br/>cultura celular</b>                   | <b>4ª geração<br/>DNA recombinante</b>         |
|-------------------------------|--|---|--|
| <b>Varíola<br/>Raiva</b>      | <b>Febre amarela<br/>Influenza</b>     | <b>Poliomielite<br/>Sarampo<br/>Caxumba<br/>Rubéola</b> | <b>Hepatite B<br/>Papiloma<br/>“Rotavirus”</b> |
| Até 1900                      | Até 1950                               | Até 1970  | Hoje   |

Atualmente temos uma série de vacinas virais que são amplamente utilizadas (apresentadas na tabela abaixo).

| <b>Vacina</b>        | <b>Fonte</b>                         | <b>Tipo</b> | <b>Rota</b>               | <b>OBS.</b>                                 |
|----------------------|--------------------------------------|-------------|---------------------------|---|
| <b>Varíola</b>       | Linfa de animais                     | Atenuada    | Escarificação<br>no braço | Erradicada                                  |
| <b>Febre amarela</b> | Ovos embrionados                     | Atenuada    | Intramuscular             | Imunização<br>prolongada                    |
| <b>Influenza</b>     | Ovos embrionados                     | Inativada   | Intramuscular             | Em torno de 70% de<br>eficiência (variação) |
| <b>Pólio</b>         | Células diplóides<br>Humanas/macacos | Atenuada    | Oral                      | Alta eficácia                               |

|                                      |                                   |            |               |   |
|--------------------------------------|-----------------------------------|------------|---------------|---|
| <b>Pólio</b>                         | Células diplóides Humanas/macacos | Inativada  | Intramuscular | Alta eficácia   |
| <b>Sarampo</b>                       | Células de embrião de galinha     | Atenuada   | Intramuscular | MMR (vacina tríplice)<br>Imunização prolongada<br>90% de eficiência |
| <b>Rubéola</b>                       | Células diplóides Humanas         | Atenuada   | Intramuscular | MMR (idem)  |
| <b>Caxumba</b>                       | Células de embrião de galinha     | Atenuada   | Intramuscular | MMR (idem)  |
| <b>Raiva</b>                         | Células diplóides Humanas         | Inativada  | Intramuscular | Administrada pré e pós-infecção                                     |
| <b>Hepatite B</b>                    | Levedura                          | Subunidade | Intramuscular | Recombinante  |
| <b>Papilomavírus (6, 11, 16, 18)</b> | Levedura                          | Subunidade | Intramuscular | Recombinante  |
| <b>Rotavirus</b>                     | Células diplóides Humanas         | Atenuada   | Oral          | “Rearranjo de genomas”  |

Várias iniciativas para disseminação de vacinas a populações menos favorecidas surgem e podem ser acompanhadas no site da Organização Mundial da Saúde (WHO), e de organizações como a PATH (<http://www.path.org>).

No Brasil temos um programa público de vacinação bem organizado, com calendários para atender a população por faixas etárias (crianças, adolescentes, adultos e idosos), além de um calendário especial para populações indígenas, que podem ser consultados no portal da saúde (<http://portal.saude.gov.br>).

À semelhança do sucesso na erradicação da varíola na década de 1970, foram estabelecidos novos objetivos. Assim, levando-se em conta a eficácia das vacinas contra o Sarampo e a Poliomielite e as características dessas doenças, a Organização Mundial da Saúde havia proposto como meta a erradicação desses vírus até o ano 2000. Esse objetivo não foi atingido, sendo que tivemos aqui em São Paulo uma forte epidemia de Sarampo nesse mesmo ano, e outros surtos no país incluindo o deste ano (2018), contrariando as expectativas otimistas. Assim é necessário um maior investimento não só no aperfeiçoamento das vacinas já utilizadas, bem como no desenvolvimento de vacinas para outros vírus como o HIV e o vírus da dengue.

### **- Manipulando os vírus para obter novas vacinas**

#### **Métodos clássicos**

##### **Atenuação**

- Procura-se isolar novas cepas com menor potencial patogênico.
- Induzir mutações em laboratório e selecionar mutantes (Ex.: termosensíveis).
- Quando o genoma viral inteiro está clonado e manipulável, pode ser feita uma atenuação “não clássica” pela inserção planejada de mutações.

##### **Inativação**

- Pode ser obtida por tratamento com agentes químicos (Ex.: formalina), físicos (Ex.: irradiação) ou mistos (Ex.: inativação por foto-adutos como psoralenos).
- Ou fracionamento, obtendo proteínas purificadas a partir de uma cultura do vírus.

## Novos Métodos

### Vacinas baseadas em proteínas recombinantes

A estratégia consiste em clonar genes de proteínas virais em sistemas de expressão para obter essas proteínas em grande quantidade. Os sistemas de bactérias, leveduras e baculovírus são os mais utilizados.

Há uma grande quantidade em teste, e os exemplos das vacinas contra hepatite B e papilomavírus em uso, mencionados anteriormente. Essas proteínas purificadas, além de serem administradas isoladamente, também podem ser incorporadas em diferentes formulações vacinais.

### Vacinas baseadas em peptídeos sintéticos

Peptídeos que contêm epítomos de células B ou T são capazes de induzir resposta humoral ou celular. Esses peptídeos podem ser obtidos por síntese química em grandes quantidades. Em geral, devido à baixa imunogenicidade, devem ser conjugados a moléculas maiores, com propriedades adjuvantes.

### Vacinas de DNA

Consistem em clonar genes de proteínas virais em plasmídeos bacterianos sob o controle de cassetes de expressão eucarióticos (entre um promotor e um sinal de poli-adenilação). Após incorporação pelas células do tecido inoculado esse antígeno é expresso e apresentado ao sistema imune.

Os métodos de administração desse DNA podem ser físicos, como a injeção de uma solução, ou o “Gene gun” (canhão de genes, Fig 10) em que o DNA é disparado por pressão contra as células ou tecido adsorvido a partículas de um metal neutro (ex.: ouro).



Fig 10

Também podem ser métodos químicos que têm como princípio a neutralização das cargas do DNA para que a célula o incorpore através da membrana citoplasmática. Isso pode ser obtido

por co-precipitação com fosfato de cálcio, formação de complexos com polímeros como DEAE-dextran e polilisina, ou através da complexação com lipídeos catiônicos formando lipossomos.

As vacinas de DNA têm sido extensivamente testadas em modelos animais com resultados promissores para uso humano, havendo também testes clínicos em andamento em humanos. São capazes de induzir resposta humoral, mas são mais eficientes na indução de resposta de células T. Regimes mistos de imunização DNA-proteína frequentemente levam a efeitos sinérgicos de proteção contra desafio pelo vírus em questão.

Exemplos de vírus alvo estudado com vacinas de DNA: HIV, papiloma, influenza, e outros. Para uso veterinário já há vacinas de DNA aprovadas (Ex.: vírus West Nile).

### **Manipulando os vírus para obter vetores vacinais**

Alguns vírus como vaccínia e outros pox vírus, adenovírus humanos e animais, e vírus adeno-associados, têm sido utilizados em vacinação ou testes clínicos demonstrando-se seguros quanto a efeitos colaterais. Esses vírus podem ser manipulados para servirem como vetores vacinais. A estratégia é clonar genes de proteínas dos vírus patogênicos (antígenos selecionados) nos genomas desses vetores virais. Após infecção das células do tecido alvo escolhido, com os vetores vacinais, esse antígeno é expresso e apresentado ao sistema imune. Vetores vacinais foram desenvolvidos para o HIV entre outros.

### **Imunogenicidade e adjuvantes**

Nem sempre um antígeno ou microrganismo, que se pretende utilizar como vacina é imunogênico (provoca resposta imune). Nesse caso, é necessário elaborar uma formulação vacinal cuja imunogenicidade pode ser aumentada pela associação de um adjuvante. Depois de comprovada a imunogenicidade e segurança da formulação vacinal em modelos animais são feitos testes em humanos.

Os adjuvantes mais comuns em vacinas utilizadas em humanos são os sais de alumínio (hidróxido e fosfato). O desenvolvimento de novos adjuvantes, mais potentes e seguros, é uma área importante em vacinologia. Podemos exemplificar com testes em andamento: saponinas, proteínas bacterianas e formulações de lipossomos.