



## Novas perspectivas em vacinas virais

### *New perspectives in viral vaccines*

Hermann G. Schatzmayr

Pesquisador do Departamento de Virologia  
Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz  
Av. Brasil 4365  
21045-900 Rio de Janeiro — RJ Brasil  
hermann@ioc.fiocruz.br

SCHATZMAYR, H. G.: 'Novas perspectivas em vacinas virais'. *História, Ciências, Saúde — Manguinhos*, vol. 10 (suplemento 2): 655-69, 2003.

Com base nas pesquisas moleculares sobre o genoma e proteínas, novas vacinas virais deverão ser utilizadas de forma rotineira nas próximas décadas. Por outro lado, espera-se que cada vez mais sejam associados diferentes antígenos imunizantes em uma mesma dose, visando a reduzir o número de aplicações de vacinas nas populações a serem imunizadas. Pela importância de sua estrutura científica e tecnológica, o Brasil deve aumentar a participação nos processos de desenvolvimento de novas vacinas e na avaliação de sua eficácia, envolvendo maior número de pesquisadores e tecnólogos, com o incremento de investimento nessas atividades.

**PALAVRAS-CHAVE:** vacinas virais, antígenos imunizantes, Brasil.

SCHATZMAYR, H. G.: 'New perspectives in viral vaccines'. *História, Ciências, Saúde — Manguinhos*, vol. 10 (supplement 2): 655-69, 2003.

*New viral vaccines, based on molecular research into genomes and proteins, should come into routine use in the coming decades. At the same time, use of different immunizing antigens within a single dose is also expected to grow more common, with the purpose of reducing the number of vaccinations administered to target populations. Given Brazil's scientific and technological importance, the country should enhance its participation in the development of new vaccines and in the evaluation of their efficacy by involving a larger number of researchers and technologists and boosting investment in these activities.*

**KEYWORDS:** viral vaccines, immunizing antigens, Brazil.

## Introdução

O uso de vacinas de forma mais ampla foi introduzido a partir do início do século passado e contribuiu de forma inequívoca para a redução da incidência das doenças infecciosas.

Nas últimas duas décadas o rápido progresso das pesquisas, em particular nas áreas da imunologia e da biologia molecular, lançou as bases de um desenvolvimento sem precedentes para a implementação de novas vacinas e de novas estratégias de vacinação em todo mundo. Assim, em 1981, a Organização Mundial de Saúde (OMS), com apoio do Unicef, lançou o Programa Expandido de Imunização, com a finalidade de imunizar 80% das crianças do mundo com as cinco vacinas básicas (poliomielite, difteria, sarampo, pertussis e tétano). Um esforço iniciado nas Américas e denominado Iniciativa para a Vacinação Infantil (CVI) contribuiu igualmente para a expansão das discussões sobre vacinas e estratégias de vacinação. Em janeiro de 2000 foi criada a chamada Aliança Global para Vacinas e Imunização (Gavi), com o Fundo para Vacinas, e ambos têm levantado recursos substanciais em nível internacional para aplicação nesse campo.

O principal problema do desenvolvimento e da produção de novas vacinas tem sido o relativo baixo interesse das indústrias farmacêuticas, pois as vacinas representam apenas 2% do mercado mundial dessa indústria (Greco, 2002).

Além disso, a labilidade dos produtos, o risco da responsabilidade por reações adversas, o alto custo de desenvolvimento das novas vacinas e os preços não atrativos, em especial pela limitada capacidade de compra pelos países em desenvolvimento, que seriam os maiores mercados de uma série de vacinas virais de grande interesse nas regiões tropicais, têm limitado os investimentos na área.

Apesar de todos esses problemas globais, é reconhecido que poucas ações de saúde pública apresentam uma relação custo-benefício tão favorável como a utilização de vacinas em uma população. Para avaliar o valor dessa relação seria suficiente compararmos, por exemplo, o custo de uma imunização completa de três doses para a hepatite B com o custo do tratamento, ao longo de vários anos, de um caso clínico da doença que venha evoluir ao estado crônico.

Ao longo dos anos o país adquiriu uma forte compreensão do valor das vacinas e hoje somos um exemplo mundial da capacidade de organizar campanhas de imunização em nível nacional, com a participação de grandes segmentos populacionais, além da existência de uma capacidade instalada de produção de vacinas de qualidade.

Com isto torna-se importante avaliar alguns aspectos atuais das vacinas e do que se espera para o setor em um futuro próximo.

### **Bases imunológicas na produção de vacinas**

O desenvolvimento de vacinas depende fundamentalmente do conhecimento dos mecanismos imunológicos envolvidos em resposta às infecções, bem como dos mecanismos de patogênese das infecções.

A primeira interação entre o patógeno e o hospedeiro ocorre ao nível das mucosas, que representam a barreira mecânica entre os meios externo e interno, dificultando ou impedindo a adesão dos vírus à superfície das células epiteliais de revestimento (Baraschi *et al.*, 2003). Estas células expressam diferentes receptores, que reconhecem e ligam patógenos, dando início ao processo de ativação celular, sintetizando e secretando novos peptídeos dirigidos principalmente para bactérias (Philpott *et al.*, 2001).

A ativação das células epiteliais induz a formação de fatores de atração de células imunes, como neutrófilos, macrófagos, células killer e linfócitos, além de células fagocitárias como macrófagos. Gera-se ainda uma resposta inflamatória local, com seus diversos componentes, inclusive o sistema do complemento.

As chamadas células dendríticas são hoje reconhecidas como as mais importantes apresentadoras de antígenos para a indução de resposta imune tanto para as células CD8<sup>+</sup> (citotóxicas e capazes de destruir células infectadas com vírus) como para as células CD4<sup>+</sup> T-helper, constituindo essas duas a base da imunidade celular. As células dendríticas distribuídas ao longo da pele e principalmente das mucosas são capazes de capturar e processar antígenos, carreando-os para nódulos linfáticos (Banchereau e Steinman, 1998).

Esses conhecimentos e o sucesso da vacina oral contra a poliomielite levaram à criação de novas propostas de vacinação através da aplicação de vacinas diretamente na pele e mucosas, como as vacinas experimentais contra a influenza e o sarampo por via nasal, a utilização da via vaginal na imunização contra o herpes simplex e a via oral para a hepatite E (Holmgreen *et al.*, 2003).

Além da resposta celular, a resistência às infecções virais depende da formação, pelo organismo, de resposta imune humoral (globulinas) aos antígenos presentes na superfície dos vírus ou na superfície das células por eles infectadas.

Essas respostas impedem que os vírus penetrem nas células do organismo ou conduzam à destruição de células já infectadas, sendo importante assinalar o papel da imunoglobulina A, que participa no processo de imunidade de mucosas, além da imunoglobulina M, de formação mais precoce, e a G, mais duradoura e responsável pela proteção do indivíduo ao longo dos anos. Os antígenos virais que não se situam na superfície da partícula têm, aparentemente, um papel secundário na resistência à infecção.

Com isso se apresentam duas linhas de defesa, relacionadas entre si, que levam à destruição das células infectadas e também

geram uma resposta duradoura, prevenindo a reinfecção pelos mesmos vírus ao longo dos anos. Essa imunidade duradoura se apóia na formação das células de memória, que, ao serem estimuladas por esses antígenos, mesmo após vários anos, são capazes de formar globulinas específicas para aqueles antígenos.

Essa possibilidade de atuação dos anticorpos preexistentes sobre infecções virais constitui a base da aplicação de gamaglobulina específica para controlar infecções virais, como no caso da globulina contra a raiva, aplicada em indivíduos recentemente infectados pelo vírus, e na hepatite viral, em que se aplica o produto em recém-nascidos de mães portadoras do vírus da hepatite B, para evitar a passagem do vírus da mãe para a criança.

### **Objetivos das imunizações**

Os objetivos principais das imunizações são prevenir o desenvolvimento do quadro clínico no indivíduo e, ao se alcançar um nível de imunidade elevado em grandes segmentos da população, se obter o controle ou mesmo a eliminação de determinada virose. Essa eliminação foi alcançada nas Américas com a varíola, com a poliomielite pelo vírus selvagem e espera-se que o mesmo ocorra, em breve, com relação ao sarampo.

Além da imunização básica realizada na primeira infância, vacinas virais podem ser utilizadas em outras fases da vida, como a vacinação anti-rábica, que é realizada quando há suspeita de que o indivíduo atacado por animal possa ter se infectado pelo vírus.

No caso da hepatite B, além da imunização dos indivíduos vivendo em áreas de risco ou apresentando maior possibilidade de infecção por suas atividades profissionais, busca-se evitar a passagem do vírus da mãe portadora de hepatite B para o recém-nascido, o que é obtido pela aplicação da vacina o mais cedo possível após o nascimento.

A adoção desse esquema de forma organizada e persistente, o que ainda não ocorreu em nosso país, reduziu de forma drástica as infecções em muitos países da Ásia, como o Japão, que teve em relação à hepatite B a mais importante infecção viral do país.

No que diz respeito à rubéola, que produz um quadro benigno, muito raramente evoluindo com complicações importantes, o alvo primário da vacinação são as mulheres em idade fértil, de forma a induzir uma imunidade que previna a multiplicação dos vírus selvagens nos tecidos embrionários. Uma vacinação extensa de crianças também é utilizada em muitos países desenvolvidos e deverá ser introduzida em nosso país.

A vacina contra a febre amarela é utilizada para prevenir a doença nas áreas endêmicas e eventualmente em áreas não-endêmicas, quando se suspeita da presença de indivíduos que se infectaram em áreas endêmicas e que possam, através do vetor *Aedes aegypti*, gerar um surto urbano da doença.

No que diz respeito à influenza, a vacina é utilizada principalmente na chamada terceira idade, que inclui os grupos de maior risco de desenvolverem quadros clínicos mais graves de infecção pulmonar. Essa vacinação é oferecida em muitos países, inclusive o Brasil, e levou a uma significativa queda da mortalidade por doença respiratória aguda nos países em que se conseguiu analisar com precisão os dados de morbidade e mortalidade desse grupo etário.

No Brasil a imunização básica para as viroses inclui a poliomielite, o sarampo, a caxumba e a rubéola, além da hepatite B e da febre amarela em regiões endêmicas, sendo possível incluir em breve também as vacinações contra a hepatite A e a varicela no país, além da vacina contra a influenza, utilizada em segmentos de idade mais avançada.

Cada estado possui ainda um centro para vacinações especiais, visando atender a necessidades específicas, como a vacina contra a poliomielite em crianças imunodeprimidas, que não podem receber vacinas do tipo oral e devem ser vacinadas com vacinas inativadas.

### **Tipos de vacina utilizados**

As vacinas virais são classificadas como vacinas vivas, que contêm vírus vivo e atenuado em laboratório, e vacinas mortas, que contêm vírus ou suas subunidades submetidos a agentes físicos ou químicos que os inativam, isto é, eliminam a capacidade de eles se multiplicarem no hospedeiro

#### **A) Vacinas vivas atenuadas**

As vacinas virais com partículas capazes de se multiplicar nos vacinados tiveram como trabalho pioneiro aquele desenvolvido por Jenner, em torno do final do século XVIII, quando utilizou material obtido de lesões de pele de animais para imunizar contra a varíola. Jenner baseou-se no fato de que ordenhadores apresentavam com frequência lesões vesiculosas nas mãos, por contágio com bovinos com lesões semelhantes, causadas por vírus do mesmo grupo da varíola. Ao contrário do restante da população, aquelas pessoas raramente apresentavam essa doença, de larga disseminação naquela ocasião na Europa.

Na Antiguidade, especialmente na China, descreveram-se práticas de expor pessoas sadias a material coletado de vesículas, bem como de crostas obtidas de pacientes de varíola. Essa prática atravessou os séculos, embora ocorressem também formas graves da doença em vacinados.

Inicialmente se utilizou o cultivo dos vírus em animais, técnica usada por Pasteur para criar sua vacina anti-rábica, através da passagem do vírus em cérebro de coelho e posterior tratamento por métodos químicos.

O ovo embrionado de galinha, introduzido na década de 1930, permitiu o cultivo de alguns vírus, como o grupo varíola vacínia e o vírus da influenza, cujas vacinas são até hoje preparadas nesse sistema.

Com o desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos, a partir também da década de 1930, quando a vacina da febre amarela foi desenvolvida, utilizando o cultivo do vírus em fragmentos de embrião de galinha em suspensão, e especialmente a partir da década de 1950, um grande número de vírus começou a ser cultivado nesses sistemas.

A cultura de tecidos passou a permitir o cultivo em condições controladas de vários vírus usados para vacina, sendo o primeiro deles o agente da poliomielite. Inicialmente com este vírus, cultivado em células renais de macaco, se obteve, com Jonas Salk, uma vacina inativada, tratando-se os vírus com formol. Mais tarde Sabin desenvolveu, no mesmo sistema de cultivo, uma vacina viva, de uso oral, que acabou por se tornar uma extraordinária ferramenta para eliminar a poliomielite das Américas e, espera-se, em breve futuro também do mundo.

As vacinas vivas apresentam algumas vantagens importantes sobre as vacinas inativadas. A principal delas é o envolvimento de todos os componentes do sistema imune no desenvolvimento da imunidade contra a partícula vacinal íntegra e que se multiplica no organismo do vacinado. Com isso a resposta imune é completa e mantém-se por longos períodos, reproduzindo muito proximamente a resposta à infecção natural.

As vacinas vivas, em geral, apresentam menor custo de produção, o que possibilita a sua utilização em grande escala, como foi o caso das vacinações contra a varíola e poliomielite, ambas com a finalidade de erradicar estas doenças do mundo.

Entre as desvantagens das vacinas vivas destaca-se a possibilidade de efeitos adversos que surgem quando da multiplicação no hospedeiro, seja por fatores individuais, seja por uma reversão genética da amostra vacinal, tornando-a mais virulenta.

Esses fenômenos foram amplamente estudados na vacina oral contra a poliomielite, quando se observam casos clínicos de doença parálitica após a vacina, com uma tendência das amostras eliminadas pelas fezes apresentarem alguns caracteres genéticos das amostras selvagens das quais derivaram. Outro problema observado é a vacinação inadvertida de crianças imunodeficientes, nas quais os vírus vacinais passam a ser eliminados por longos períodos de tempo.

Efeitos adversos foram observados na vacina contra a varíola, algumas vezes graves, e mais recentemente também foram identificados nas vacinas contra a caxumba e a febre amarela.

Outro problema que ocorre com as vacinas vivas é a possibilidade de sua deterioração durante o processo de transporte e armazenagem, exigindo, para aquelas que não podem ser liofilizadas, a montagem de uma extensa rede de refrigeração, para permitir que o produto chegue ao receptor em perfeitas condições de uso.

### **Novas tecnologias para o preparo de vacinas vivas**

Os processos de atenuação de virulência tradicionalmente utilizados para a obtenção de vacinas vivas se baseiam em passagens dos vírus em células de hospedeiros diversos e em diferentes condições e temperaturas, levando ao surgimento de mutantes menos virulentos, sendo freqüentemente difícil definir com clareza os mecanismos dessa atenuação. Assim, por exemplo, nunca foi possível reproduzir as mutações que geraram a vacina contra a febre amarela, apesar de serem utilizadas as mesmas condições experimentais.

O avanço da biologia molecular permitiu reconhecer algumas mutações envolvidas com a modificação de virulência de alguns vírus, como o da poliomielite, sendo este o mais bem estudado desse ponto de vista.

O contínuo progresso da biologia molecular deverá permitir o desenvolvimento de partículas virais com modificações dirigidas que levem à criação de partículas atenuadas e estáveis, em condições de serem aplicadas como imunizantes. Entre estas técnicas se destacam as seguintes:

#### **Deleções**

As deleções representam a retirada da partícula viral de segmentos genômicos, com a eliminação de uma ou mais proteínas, conduzindo a atenuação da amostra para o hospedeiro. Essas proteínas podem ser responsáveis pela virulência da amostra ou por um mecanismo de fuga ao sistema imunológico. Como muitas dessas deleções são de difícil restauração pelos vírus, considera-se que constituem um mecanismo seguro de se obter mutantes ainda imunizantes, porém de mais baixa virulência.

As deleções têm sido mais facilmente obtidas em vírus maiores, nos quais ocorrem regiões não-essenciais para a replicação. A retirada de genes específicos tem reduzido, por exemplo, a infecção de neurônios e diminuído a neurovirulência de amostras do vírus herpes simplex, para o qual não se dispõe ainda de uma vacina eficaz.

#### **Inserções**

Ao contrário das deleções, neste caso, fragmentos genômicos são inseridos nas partículas virais, visando à redução de sua virulência. Utilizam-se genes que codificam proteínas com atividade antiviral, como o interferon, fator de necrose tumoral e interleucinas. Nessas condições a replicação viral é limitada, mas poderá ser suficiente para produzir anticorpos no hospedeiro. Exemplo notável é o vírus respiratório sincicial, agente de um quadro respiratório grave em crianças e no qual a inserção do gene do interferon gama levou a uma atenuação da amostra, mantendo-se uma excelente resposta humoral.

Embora os resultados obtidos tenham sido pontualmente excelentes, quando da inserção de um ou mais fatores em partículas virais, não

se sabe como se comportarão essas amostras modificadas ao longo do processo de preparo de vacinas, principalmente no organismo humano.

#### Quimeras virais

Denominam-se quimeras virais as partículas não existentes na natureza e que são obtidas por introdução de fragmentos de um vírus em outro, em geral, mas não necessariamente, da mesma família. Exemplos dessa tecnologia, que vem se expandindo fortemente, são numerosos, como a utilização do vírus vacinal da febre amarela para expressar fragmentos de outros flavivírus, como dengue e encefalite japonesa B. No caso do dengue, partículas do tipo 4 foram utilizadas para a construção de quimeras contendo os demais tipos.

Uma vacina em estudos contra o rotavírus, importante agente de diarreias virais, contém três quimeras virais com base no rotavírus símio. Quimeras do vírus da influenza contendo a neuraminidase e a hemaglutinina mais atuais foram desenvolvidas, embora ainda não tenham sido utilizadas na imunização humana.

Essa tecnologia tem sido usada largamente, utilizando-se vírus do grupo pox, os quais, por sua estrutura e tamanho, têm permitido a expressão de inúmeros antígenos de outros grupos de vírus. Assim, por exemplo, uma quimera vacínia-raiva está sendo usada na Europa para imunizar raposas na natureza.

Uma amostra do vírus vacínia denominada Ancara, obtida por sucessivas passagens em embrião de galinha, mostrou-se de muito baixa virulência e tem grande potencial para ser utilizado como vetor de vírus, como o vírus do sarampo. Além do vírus vacínia, são utilizados poxvírus de aves, como o canaripox, que replicam pobremente em células humanas e, assim, podem ser utilizados até mesmo em indivíduos com deficiências imunológicas.

#### Vacinas de ADN viral

Um novo método de se obter imunidade foi desenvolvido através da inoculação, diretamente no indivíduo, de fragmentos genômicos de células contendo ADN viral do vírus contra o qual se quer imunizar, juntamente com fatores promotores de sua multiplicação. Esses fragmentos são capazes de se multiplicar em células como os miócitos do hospedeiro e formar as proteínas imunizantes no vacinado. Vírus respiratórios, em especial o da influenza, apresentaram uma resposta adequada nos experimentos iniciais, expandidos posteriormente a outros vírus.

Essa tecnologia tem a grande vantagem de as glicoproteínas imunizantes serem formadas ao nível da superfície das células e, portanto, apresentadas ao sistema imune em sua forma nativa, sem qualquer processo de manipulação que possa causar modificações nos antígenos. A resposta imunológica, porém, tende a ser baixa. Várias propostas de melhorá-las foram apresentadas, como a utilização de promotores de

replicação mais potentes e capazes de induzir a multiplicação em grande variedade de células do hospedeiro.

A adição de outros genes dos vírus em análise foi igualmente sugerida e espera-se, em um futuro próximo, o amplo desenvolvimento dessa tecnologia, embora seja, por vezes, apontado o risco teórico da introdução no organismo de um ácido nucléico viral capaz de, eventualmente, se integrar ao genoma do vacinado, com resultados imprevisíveis.

#### Vacinas inativadas

As vacinas inativadas são utilizadas rotineiramente na prevenção de inúmeras doenças, como a influenza, poliomielite (vacina tipo Salk), raiva e hepatite A. Os vírus são inativados por vários métodos químicos, em particular o formol ou detergentes, como na influenza.

No caso da hepatite B, uma vacina foi desenvolvida a partir dos vírus contidos no sangue de portadores crônicos de hepatite. Por processos de purificação e concentração a partir do plasma de portadores crônicos do vírus, são separadas as partículas esféricas do vírus, com cerca de 22nm de diâmetro, as quais são submetidas ao formol, para inativação.

Essa vacina, ainda usada em alguns países asiáticos, sofreu grandes restrições com o surgimento do vírus HIV, pela possibilidade teórica da presença deste vírus no produto final, embora isto nunca tenha sido demonstrado.

Com isto optou-se, no caso da hepatite B, pela vacina obtida por expressão do antígeno imunizante do vírus em leveduras, que se constituiu na primeira vacina utilizada em larga escala obtida por técnicas de recombinação genética. Essa vacina inativada se tornou também a primeira vacina anticâncer desenvolvida, uma vez que expressiva porção dos portadores crônicos de hepatite B evolui para o carcinoma primário do fígado.

As vacinas inativadas oferecem como grande vantagem mais segurança, pois não há multiplicação do agente no organismo do vacinado, porém, tendem a induzir uma imunidade menos duradoura e a exigir, com isso, a aplicação de mais de uma dose no esquema de imunização, bem como a repetição das imunizações ao longo dos anos. Exemplo típico são as vacinas inativadas contra a influenza, que devem ser aplicadas a cada ano. Este fato significa um custo mais alto na utilização desses produtos.

#### **Novas tecnologias para o preparo de vacinas inativadas**

Entre as novas tecnologias que têm colaborado para o desenvolvimento de vacinas inativadas destaca-se o uso da tecnologia do DNA recombinante para o preparo de antígenos protetores em mais larga escala, como no caso da hepatite B.

São empregadas principalmente células de leveduras, de insetos e de mamíferos. Os procedimentos para a expressão desses antígenos incluem várias fases. De início devem ser identificados com precisão os antígenos produtores da imunidade a serem produzidos pelas células ao nível laboratorial. Esses antígenos devem ser induzidos de forma que as quantidades obtidas sejam elevadas e sua purificação tecnologicamente viável.

No caso de células de mamíferos, o cuidado maior é a eliminação de potenciais fatores oncogênicos originários das células que servem de substrato, considerando a possibilidade de os mesmos serem eventualmente mantidos nas vacinas e introduzidos nos vacinados.

Os exemplos mais notáveis desse tipo de vacina, como assinalado, são aquelas desenvolvidas para a hepatite B, inicialmente em *Sacharomyces cerevisiae* e mais tarde em outras leveduras com maior capacidade de produção. Essas vacinas são muito usadas hoje no mundo, inclusive no Brasil. Outro exemplo em fase experimental é a produção de antígenos do vírus rábico e do papiloma humano, igualmente em leveduras.

O uso de baculovírus, que são vírus de insetos, tem se mostrado igualmente um sistema eficiente de produção de antígenos protetores para as hepatites A e E.

Apesar do maior risco teórico presente nas células de mamíferos, a formação das proteínas virais em seu interior é idêntica ou muito próxima da que ocorre na doença natural no homem. Com isso se observa uma alta identidade entre essas proteínas, gerando, conseqüentemente, uma resposta imunológica mais próxima da infecção natural.

A obtenção de proteínas virais animais em células vegetais é apontada como um caminho promissor. É possível, por exemplo, obter proteínas da doença hemorrágica do coelho e do vírus da hepatite B em plantas de batata e, igualmente, antígenos de hepatite B e raiva em plantas do tabaco (Koprowski e Yusibov, 2001; Schatzmayr, 2002). O uso simultâneo de vegetais modificados para alimentação e para vacinação tem sido apresentado como uma possibilidade real, como a produção de proteínas do vírus da aftosa por plantas de alfafa transgênica.

Para se obter a formação de proteínas animais em vegetais há dois caminhos principais: a introdução no genoma da planta do fragmento do vírus animal a ser produzido ou a infecção da planta com vírus vegetal modificado geneticamente para gerar, durante a sua replicação, as proteínas virais desejadas.

Em realidade demonstrou-se que as células vegetais e animais geram proteínas por sistemas praticamente idênticos, diferentemente das bactérias, por exemplo, que raramente produzem proteínas virais completas.

Apesar disso, alguns exemplos bem-sucedidos do uso de bactérias para obter proteínas virais destinadas à imunização são a expressão do vírus do papiloma em *Escherichia coli* e do vírus do papiloma humano

tipo 16 em *Salmonella typhimurium*. Este último é um agente reconhecido de câncer de trato genital na mulher.

No caso dos vírus papiloma foram obtidas proteínas dos principais tipos associadas ao câncer cervical e foram induzidos anticorpos em animais de experimentação em diversos sistemas testados. Em um deles, bactérias transformadas, contendo proteínas do capsídeo viral, induziram anticorpos demonstráveis tanto no soro como nas secreções de mucosa.

Outra forma de preparar antígenos virais para a imunização é a geração de peptídeos sintéticos no laboratório, a partir do conhecimento da estrutura das proteínas virais. Essa linha de trabalho começou em vírus de bactérias e se expandiu para vírus animais. A avaliação global dos resultados obtidos indica, no entanto, que a resposta imune obtida em modelos animais é, em regra, baixa e não se espera que a situação se modifique substancialmente, embora os estudos sobre proteínas virais estejam em grande expansão.

### **Vacinologia reversa**

A mais moderna tecnologia aplicada na produção de vacinas é a denominada vacinologia reversa, desenvolvida nos últimos três anos. É feito o seqüenciamento do genoma do agente, a análise de suas proteínas, previstas através da bioinformática e com base nas características hidrofóbicas ou hidrofílicas, determinando-se a posição provável das proteínas dentro do microorganismo. Finalmente é avaliada sua capacidade teórica de produzir resposta imune. Os peptídeos selecionados podem, então, ser sintetizados ou expressos em vetores para a comprovação de sua real capacidade de induzir imunidade em animais (Adu-Bobie *et al.*, 2003).

Essa tecnologia tende a substituir os métodos tradicionais de preparo de vacinas, em especial para bactérias nessa primeira fase, podendo ser aplicada também a vírus. Através dela elimina-se a necessidade de que os agentes sejam inicialmente cultivados e modificados em suas características de virulência ou os fragmentos do vírus e bactérias sejam isolados e purificados previamente, antes de serem inoculados para a análise de sua resposta imune.

### **Outros aspectos importantes**

#### **Adjuvantes**

Adjuvantes são substâncias adicionadas à vacina em sua formulação final, com a finalidade de aumentar a resposta imunológica do receptor. Os únicos adjuvantes licenciados para uso humano em larga escala são os sais de alumínio, hidróxido ou fosfato. As proteínas vacinais se unem ionicamemente com os sais de alumínio e formam uma suspensão

microscópica, da qual os vírus são liberados lentamente no organismo, aumentando a resposta humoral de anticorpos. Esses adjuvantes têm pouca ação sobre a formação da imunidade celular. Um outro adjuvante, denominado MF59, baseado na formação de uma emulsão água em óleo, foi licenciado recentemente para a influenza.

Uma série de novos adjuvantes tem sido estudada com resultados variáveis, sendo possível que novos produtos sejam introduzidos em futuro próximo.

#### Vacinas para neoplasias

Numerosos modelos animais têm demonstrado que as células T CD8+ e CD4+ têm papel importante na erradicação de tumores. As células CD8+ lisam células tumorais e as células CD4+ agem através da secreção de citocinas e no estímulo a uma forte resposta inflamatória na área do tumor.

A base do desenvolvimento da imunoterapia para o câncer, com vários tipos associados a vírus, é a existência de proteínas específicas formadas pelo tumor e que são reconhecidas pelas células T. Essas proteínas não são expressas pela célula normal e estão sendo identificadas em larga variedade de tumores, como melanomas e tumores de mama, próstata, cólon, ovário, pâncreas, leucemias, entre outros. Essas proteínas podem ser obtidas por expressão em vetores e administradas aos pacientes, visando a estimular a resposta imune contra as células tumorais.

Os principais problemas encontrados no tratamento têm sido a descoberta das proteínas que causam a melhor resposta imune em cada tipo de tumor e a dificuldade em introduzir no hospedeiro as proteínas preparadas em laboratório, de maneira a induzir uma forte resposta imunológica.

Vários sistemas de administrar essas proteínas têm sido propostos, como a via venosa, a vacinação intradérmica, o uso da via oral, incluindo-se as proteínas em cápsulas para lenta liberação e a adição de adjuvantes orgânicos obtidos, por exemplo, a partir de membranas bacterianas.

Os melhores resultados clínicos têm sido obtidos com melanomas e espera-se, em futuro breve, que novos resultados favoráveis sejam descritos (Kalos, 2003).

#### Vacinas virais ainda não desenvolvidas

Apesar do sucesso no preparo de diversas vacinas virais importantes, é marcante que muitas infecções ainda careçam de um agente imunizante, sendo exemplos claros a Aids, o herpes simplex e o dengue.

No caso da Aids, o agente etiológico vírus HIV apresenta uma grande capacidade de se modificar ao longo do ciclo replicativo dentro da célula. Isso ocorre principalmente porque o vírus, que é ARN,

contendo portanto ácido ribonucleico em seu genoma, modifica-se, por ação de sua enzima transcriptase reversa, para vírus ADN (cADN), forma pela qual será capaz de se ligar ao genoma da célula de forma estável. Nessa transformação ocorrem muitos erros e se formam partículas de variada estrutura genômica, as quais vêm a ser liberadas pela célula no organismo. Assim, no indivíduo infectado surgem vários clones virais, que são eventualmente transmitidos a outras pessoas, não sendo possível preparar vacinas capazes de imunizar todos os clones que se formam.

O vírus do herpes simplex é capaz de permanecer em células nervosas do indivíduo, causando recidivas eventuais por fatores variados, como estresse e ciclo menstrual. Uma forte imunidade celular e uma imunidade duradoura ao nível de mucosas, em particular a genital, seriam essenciais para a proteção, mas esses objetivos ainda não foram alcançados.

O dengue é causado por quatro tipos de vírus, os quais devem estar todos presentes na futura vacina, uma vez que, após uma infecção por um tipo de dengue, as infecções sucessivas pelos outros tipos tendem a ser de maior gravidade. Vacinas para o dengue preparadas por métodos tradicionais de redução de virulência por sucessivas passagens em vários hospedeiros estão em estudos clínicos e vacinas experimentais, com a expressão de fragmentos do vírus em vários sistemas, estão em estágio pré-clínico, não sendo possível prever quando estarão disponíveis para uso em larga escala.

Muitos outros exemplos poderiam ser discutidos, considerando que centenas de vírus são capazes de infectar o homem, inclusive vírus novos, alguns de alta letalidade e que têm surgido nas últimas décadas. Entre estes destacam-se Ebola, Sabiá, Lassa e outros agentes de febres hemorrágicas, além dos hantavírus e do novo coronavírus encontrado na Ásia, causadores de quadro respiratório agudo, e de dezenas de vírus, transmitidos por mosquitos e carrapatos, presentes nas áreas tropicais do mundo.

Certamente os métodos tradicionais de preparo de vacinas não serão capazes de responder a toda essa demanda e os novos métodos moleculares serão essenciais para uma mudança desse panorama.

### **A produção de vacinas no país**

O Brasil, desde os trabalhos pioneiros de Oswaldo Cruz e Vital Brasil, seguidos por vários outros ao longo do século XX, foi capaz de produzir grande parte dos imunobiológicos que necessitava para a sua população. A partir da década de 1980 um plano nacional de investimentos em instalações e equipamentos nos produtores estatais resultou em uma grande revitalização da área, sendo atingida grande parte das metas propostas dentro das tecnologias então disponíveis.

Esse plano nacional não só permitiu o financiamento dos laboratórios produtores, como o Instituto Butantã (SP) e Bio-

Manguinhos (RJ), como ainda estabeleceu metas e definiu o que caberia a cada grupo, evitando a superposição de atividades e estimulando a realização de pesquisas de desenvolvimento em comum de novos produtos.

Entretanto, nesse campo tecnológico, em que os novos desenvolvimentos ocorrem com grande rapidez, é necessário manter as pesquisas de boa qualidade, sem o que não se consegue avançar de modo efetivo. Estrategicamente, a par das aplicações em instalações, faltaram no país investimentos mais substanciais das agências financiadoras nas pesquisas básica e tecnológica aplicadas a vacinas e imunobiológicos em geral.

Assinale-se que nas últimas décadas ocorreu um grande crescimento do interesse no campo do desenvolvimento e da utilização de vacinas, bem como um grande aumento das taxas de cobertura vacinal no mundo. Isso foi acompanhado por um maior investimento no desenvolvimento de vacinas para uso humano e em suas técnicas de preparo em maiores volumes e de aplicação nas populações.

Um esforço deve ser realizado para que maior número de pesquisadores e tecnólogos atue na área de vacinas no país, reduzindo a dependência de tecnologia externa, em especial naquelas vacinas em que há mais interesse em sua obtenção pelos países em desenvolvimento.

Atualmente são preparadas no país as vacinas virais humanas contra a febre amarela, o sarampo, a raiva, a poliomielite e a hepatite B, estando em fase de avaliação ou desenvolvimento, diretamente ou através de parcerias internacionais, a implantação do preparo das vacinas contra a rubéola, a caxumba, a varicela e a hepatite A, além do aperfeiçoamento das atuais vacinas para a febre amarela e a raiva.

### **Conclusão**

O desenvolvimento de novas vacinas constitui um investimento elevado e exige a participação de equipes multidisciplinares, desde os níveis de bancada à avaliação no campo. Frequentes são as associações de grupos de mais de uma instituição, e mesmo de mais de um país, potencializando conhecimentos para que sejam obtidos resultados mais rápidos, e nosso país não deve ficar à margem desse processo.

As técnicas de biologia molecular, por outro lado, deverão se expandir e permitir, ao longo dos próximos anos, o desenvolvimento de novas vacinas através da manipulação genética, retirando segmentos do vírus ligados à sua virulência, criando novas partículas com a presença de segmentos de mais de um vírus, e a modelagem das proteínas através da bioinformática.

Devem ser desenvolvidos igualmente sistemas de cultivo de vírus e obtenção de antígenos protetores em maior escala, reduzindo-se o custo dos produtos.

Sistemas de encapsulamento de antígenos, de modo que sejam liberados mais lentamente no organismo, e com isso atingir maior número de células alvo do sistema imune, vêm sendo desenvolvidos, e novas vias de inoculação vêm sendo estudadas, em particular a introdução através da pele e em mucosas, sítios primários da infecção do organismo pela grande maioria dos vírus.

A possibilidade de associação do maior número possível de antígenos a serem aplicados em uma única dose vem sendo avaliada por todos os grandes produtores de vacina. O crescimento demográfico e a dificuldade de se repetirem vacinações sucessivas nos mesmos segmentos populacionais têm levado a diversas propostas com o grande objetivo de se chegar a uma vacina multivalente, incorporando na mesma dose todos os antígenos protetores utilizados na imunização básica.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ada, Gordon L. et al. 1997 'Vaccines, vaccination and the immune response'. *John Curtin School of Medical Research*. Lippincott-Raven, pp. 1-236.
- Ada, Gordon L. 1994 'The development of new vaccines'. Em *Vaccination and human health* London School of Hygiene & Tropical Medicine, Wiley, pp. 67-80.
- Adu-Bobie, Janette et al. 2003 'Two years in reverse vaccinology'. *Vaccine*, vol. 21, pp. 605-10.
- Baraschi, Diana et al. 2003 'INNAMORA, an European workshop focused on the mechanisms of innate immunity in pathogen-host interaction and their exploitation in novel mucosal immunization strategies'. *Vaccine*, vol. 21(2), pp. 1-11.
- Bauchereau, J. et al. 1998 'Dendritic cells and the control of immunity'. *Nature*, 293, pp. 245-52.
- Doherty, Peter C. et al. 1997 'Immune response to viral infection'. Em *Viral Pathogenesis*. Lippincott-Raven, pp. 143-62.
- Ellis, Ronald 2001 'Technologies for the design, discovery, formulation and administration of vaccines'. *Vaccine*, vol. 19, pp. 2.681-7.
- Greco, M. 2002 'The future of vaccines: an industrial perspective'. *Vaccine*, vol. 20, pp. 101-3.
- Holmgreen, Jan et al. 2003 'Mucosal immunization and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges'. *Vaccine*, vol. 21(2), pp. 89-95.
- Koprowski, Hillary et al. 2001 'The green revolution: plants as heterologous expression factors'. *Vaccine*, vol. 19, pp. 2.735-41.
- Murphy, Brian R. et al. 2001 'Immunization against viral diseases'. Em *Virology*. 4<sup>a</sup> ed., Lippincott-Raven, pp. 435-67.
- Philpott, D. J. et al. 2001 'Innate immune responses of the epithelial cells following infections with bacterial pathogens'. *Current Opinion in Immunology*, vol. 13, pp. 410-6.
- Schatzmayr, Hermann 2002 'Use of plants as vectors for production of biomedical products'. *Virus Reviews & Research*, vol. 7, pp. 21-7.

Recebido para publicação em outubro de 2002.

Aprovado para publicação em julho de 2003.