

Lilybeth de Andrade Figueiredo

Vacinas, novas perspectivas

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2014

Lilybeth de Andrade Figueiredo

Vacinas, novas perspectivas

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2014

Lilybeth de Andrade Figueiredo

Vacinas, novas perspectivas

Lilybeth de Andrade Figueiredo

Trabalho apresentado à Universidade Fernando
Pessoa como parte dos requisitos para obtenção
do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Sumário

As vacinas são uma das maiores descobertas da medicina moderna e têm contribuído para salvar a vida de milhares de milhões de pessoas em cooperação com outras medidas de saúde pública (ao nível do saneamento básico, antibióticos, etc.). As vacinas tiveram um forte impacto no combate a muitas doenças, tendo sido a erradicação da varíola uma das maiores conquistas. No entanto, esta área enfrenta ainda desafios complexos, como são os casos do HIV, tuberculose e malária.

Os benefícios das vacinas são elevados quando as mesmas são usadas amplamente, no entanto, os custos de produção, distribuição e preservação são elevados sendo dos principais problemas para os países em desenvolvimento, constituindo desta forma um dos principais obstáculos para alcançar uma cobertura vacinal global.

Estas limitações levam à necessidade de torná-las mais eficazes, seguras, de produção mais rápida e eficientes, procurando evitar alguns dos seus maiores problemas como a refrigeração, doses múltiplas e injeções intramusculares.

Nas últimas décadas foram pesquisadas e estudadas exaustivamente novas tecnologias associadas às vacinas, assim como, foram optimizadas novas formas de administrar e de apresentar os antigénios aos diversos componentes do sistema imunitário.

Estas tecnologias incluem mecanismos de produção em que vacinas produzidas em culturas de células são mais rentáveis em comparação com as vacinas que recorrem a ovos. No entanto têm sido implementadas novas estratégias com o objectivo de aumentar a eficácia das vacinas, têm sido implementadas, como é o caso dos adjuvantes, da eletroporação, das vias de imunização e do prime-boost. Finalmente, tem-se tentado encontrar formas diferentes de activar o sistema imunitário através de; vacinas baseadas em proteínas recombinantes; vacinas de DNA; partículas semelhantes a vírus; vacinas universais; vacinas baseadas em vectores virais e vacinas baseadas em péptidos.

Nesta área estão constantemente a surgir novas tecnologias de vacinas mais seguras eficazes e de baixo custo. Apesar de algumas estarem ainda em fase experimental, existe um enorme potencial para o surgimento de novas vacinas num futuro próximo, com produção em larga escala, mais eficazes e seguras.

Palavras-Chave:

“Partículas semelhantes a vírus”, “Adjuvantes”, “Vias de imunização”, “Eletroporação”, “Prime-boost”, “Vacinas de DNA”, “Vector viral”, “Proteína recombinante”, “Péptidos” e “Vacina universal”.

Summary

Vaccines are one of the greatest discoveries of modern medicine, they have saved the lives of billions of people in cooperation with other public health measures (sanitation, antibiotics, etc.). The vaccines had an impact in reducing many diseases, being the eradication of smallpox one of its greatest achievements. However this area still faces difficult challenges, such as HIV, tuberculosis and malaria.

The benefits of vaccines are high when used widely, however, the costs of manufacturing, distribution and preservation of vaccines are costly and major impediments to developing countries themselves, and represents a major obstacle to achieving global immunization coverage.

These limitations lead to the need of improving vaccines to be more effective, safer, faster and more efficient production thus avoiding some of their biggest problems, such as refrigeration, multiple doses and intramuscular injections.

In recent decades there have been exhaustively studied and researched new technologies associated with vaccines, as well as new forms were optimised to manage and present the antigens to the various components of the immune system.

These technologies include mechanisms that vaccines produced in cell culture are more cost effective in comparison with the vaccine produced in eggs. Strategies for the purpose of increasing the effectiveness of vaccines such as adjuvants, electroporation, routes of immunisation, and the prime-boost. Finally, find different ways to activate the immune system such as vaccines based on recombinant proteins; DNA vaccines; virus-like particles; universal vaccines; vaccines based on viral vectors and vaccines based on peptide.

In this area, there are constantly arising new technologies of safer vaccines, effective and inexpensive. Although some of the technologies are still in experimental stages, there is huge potential for the emergence of new vaccines, with large-scale production, effective and safe in the near future.

Keywords:

“Virus-Like Particle”, “Adjuvants”, “Routes of immunization”, “Electroporation”, “Prime-Boost”, “DNA vaccines”, “Viral vector”, “Recombinant protein”, “Peptides”, “Universal vaccine”.

Dedicatória

Aos meus pais...

...por tudo!

Agradecimentos

Agradeço à minha família pelo apoio e compreensão prestados ao longo destes cinco anos...

Aos amigos e colegas...

À Universidade Fernando Pessoa...

Ao Professor Doutor Ricardo Magalhães pela orientação na elaboração deste trabalho e pela disponibilidade e dedicação que sempre demonstrou...

...Um muito obrigada!

Índice Geral

Sumário.....	v
Summary.....	vii
Dedicatória.....	ix
Agradecimentos.....	x
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Tabelas.....	xiv
Abreviaturas.....	xv
I. Introdução.....	1
1. Enquadramento Teórico.....	1
i. História das vacinas.....	2
ii. Definição de vacina.....	2
iii. Tipos de vacinas profiláticas tradicionais.....	3
a) Vacinas inactivadas.....	3
b) Vacinas vivas atenuadas.....	3
II. Novas tecnologias de vacinas em desenvolvimento.....	5
1. Estratégias de produção de vacinas.....	5
i. Vacinas produzidas em ovo.....	5
ii. Vacinas independentes do ovo.....	6
iii. Partículas semelhantes a vírus.....	6
2. Novos tipos de vacinas.....	9
i. Vacinas de DNA.....	9
ii. Vacinas baseadas em vectores virais.....	13
iii. Vacinas baseadas em proteínas recombinantes.....	16
iv. Vacinas baseadas em péptidos.....	18
v. Vacinas baseadas em VLPs.....	19
vi. Vacina Universal.....	22
3. Incremento de eficácia das vacinas.....	25
i. Adjuvantes.....	25
ii. Vias de imunização.....	28
a) Via transdérmica.....	28

b) Via nasal.....	30
c) Via oral.....	30
iii. Eletroporação (EP)	31
iv. Prime-Boost.....	34
III. Conclusão.....	37
IV. Bibliografia	39

Índice de Figuras

Figura 1 – Representação esquemática do plasmídeo de DNA. Contém o promotor (CMV), adjacente ao gene que codifica o antígeno (GI), poli-adenilação (poli-A), gene que corresponde a resistência de antibióticos (Res) neste caso ampicilina (Amp) e origem da replicação na bactérias (OR)	9
Figura 2 – Representação da preparação, entrega e produção de resposta das vacinas de DNA.....	10
Figura 3 – Representação das vacinas de DNA para o vírus influenza.....	12
Figura 4 – Representação das vacinas de vector viral para o vírus influenza	15
Figura 5 – Representação das vacinas de proteínas recombinantes para o vírus influenza	17
Figura 6 – Representação da expressão da proteína da cápside L1 na produção de VLPs	19
Figura 7 – Representação da próxima geração de vacinas contra o HPV	21
Figura 8 – Representação das vacinas de VLPs para o vírus influenza	22
Figura 9 – Comparação entre uma injeção intramuscular e entre microagulhas	28
Figura 10 – Diferentes tipos de microagulhas	29
Figura 11 - Representação do processo de eletroporação	32
Figura 12 – Representação do aumento da imunogenicidade que pode ser alcançado com a entrega da vacina de DNA através da injeção intramuscular com EP	33

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Vacinas produzidas em ovos.....	6
Tabela 2 - Novas abordagens de produção de vacinas contra o vírus influenza e seus estados clínicos.....	13
Tabela 3 – Alvos antigénicos para as vacinas contra gripe universal.....	23
Tabela 4 – Vários tipos de adjuvantes moleculares e as respostas que induzem	27
Tabela 5 - Estratégias de vacinação prime-boost heterólogos e propriedades das vacinas para contribuição da eficácia	35
Tabela 6 – Vacinas com Prime-Boost heterólogos comuns	36

Abreviaturas

AAV – *Adeno-Associated Virus* – Vírus Adeno-Associados

Ad – Adenovírus

Amp - Ampicilina

APCs – *Antigen Presenting Cells* - Células Apresentadoras de Antígenos

AS03 – Sistema adjuvante 03 - *Adjuvant system 03*

CMV – Citomegalovírus

CMV – *Cucumber Mosaic Virus* - Vírus Mosaico do Pepino

CTL – *Cytotoxic T Lymphocytes* – Linfócitos T Citotóxico

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* – Ácido desoxirribonucleico (ADN)

E. coli – *Escherichia coli*

EP – Eletroporação

GM-CSF – *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* - Factor Estimulante de Colônias Granulócitos e Macrófagos

HA – Hemaglutinina

HBV – *Hepatitis B Virus* – Vírus da Hepatite B

HBsAg – Antígeno de superfície da hepatite B

HCV – *Hepatitis C Virus* - Vírus da Hepatite C

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* – Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA – *Human Leukocyte Antigen* – Antígeno Leucocitário Humano

HPV – *Human Papillomavirus* – Vírus do Papiloma Humano

IFA - *Incomplete Freund's adjuvant* – Adjuvante de Freund incompleto

INF – Interferão

LAIV – *Live Attenuated Influenza Vaccine* - Vacina Influenza Viva Atenuada

M1 – Proteína de Matriz 1

MF59 – Emulsão óleo em água

MHC – *Major Histocompatibility Complex* – Complexo Principal de Histocompatibilidade

MVA – *Modified Vaccinia Ankara* – Vírus Vaccinia Ankara Modificado

NA- Neurominidase

NP – Nucleoproteína

OR – Origem Replicação

Poli-A – Poli-adenilação

PVX – *Potato Virus X* - Vírus Batata X

RNA – *Ribonucleic Acid* – Ácido Ribonucleico (ARN)

TMV – *Tobacco Mosaic Virus* - Vírus do Mosaico do Tabaco

VLP – *Virus Like Particle* – Partículas Semelhantes Vírus

I. Introdução

1. Enquadramento Teórico

O sucesso das vacinas actuais deve-se à capacidade de atingir os patogéneos que têm baixa variabilidade antigénica e que dependem da protecção da imunidade mediada por anticorpos. Este é o caso das vacinas contra a poliomielite, tétano, difteria, sarampo e hepatite B as quais têm sido bem sucedidas. Estas vacinas foram desenvolvidas num suporte empírico, baseando-se especialmente na atenuação ou na inactivação de patogéneos (Nascimento & Leite, 2012).

As vacinas, para serem eficazes, devem induzir imunidade protectora sem que provoquem patogenicidade. No entanto, a existência de microrganismos com elevada variabilidade antigénica levam à constante alteração e à perda da capacidade de induzir imunidade protectora (Sadanand, 2011).

Avanços nesta área têm sido revolucionários através dos progressos da imunologia, biologia molecular, bioquímica, genómica e proteómica, alargando o campo da vacinologia (Nascimento & Leite, 2012).

Hoje em dia, as vacinas dependem da estabilidade do antigénio, assim como da sua capacidade de induzir resposta imunitária (Sadanand, 2011). O ideal seria obter vacinas capazes de induzir todos os tipos de respostas imunitária, eficazes em todos os indivíduos, de baixo custo e de rápida produção (Singh *et al.*, 2010).

Um dos problemas a ultrapassar será o facto da vacinação nos idosos não ser tão eficaz como nos jovens (Derhovanessian & Pawelec, 2012). No entanto, o envelhecimento está associado a uma diminuição da imunidade humoral, inata e celular, como consequência disto há limitações, como é o caso de títulos de anticorpos diminuída, consequentemente a vacinação para imunidade dos idosos está comprometida. Contudo é possível melhorar as vacinas para os idosos adicionando adjuvantes e avaliando novas vias de imunização (McElhaney, 2011).

i. História das vacinas

A história das vacinas e a sua aplicação na prevenção de doenças infecciosas acumulam mais de 200 anos. Foi iniciada pelo médico e pesquisador Edward Jenner e Louis Pasteur (Diniz & Ferreira, 2010).

A vacina contra a varíola foi desenvolvida por Edward Jenner, no século XVIII (Homma *et al.*, 2011). O médico verificou que as ordenhadoras apresentavam pústulas nas mãos, por contágio com bovinos, com lesões semelhantes à varíola humana (Schatzmayr, 2003). Estas pessoas que desenvolviam esta condição benigna, conhecida por vaccinia, não eram contagiadas com a varíola. Desta forma, Jenner inoculou um rapaz de oito anos saudável com o pus de uma pústula de uma ordenhadora. O rapaz apresentou sintomas benignos de vaccinia, tendo sido de seguida inoculado com o vírus da varíola humana. Após a exposição da varíola o rapaz não desenvolveu doença apresentando imunidade. Posteriormente, Louis Pasteur identificou a causalidade entre as doenças infecciosas e microorganismos e demonstrou que era possível prevenir doenças através da inoculação de microrganismos atenuados, conseguindo desta forma imunidade de longa duração. Pasteur deu o nome de vacina às preparações de um agente patogénico atenuado para imunizações de doenças infecciosas, em homenagem a Edward Jenner (Alves *et al.*, 2007). Pasteur observou que agentes patogénicos podem ser atenuados pela exposição às agressões ambientais, tais como temperaturas elevadas, oxigénio e produtos químicos (Sadanand, 2011). Em 1885, Louis Pasteur desenvolveu uma nova vacina contra a raiva, confirmando desta forma a hipótese de atenuação (Homma *et al.*, 2011).

Graças a estas descobertas, a vacinação tem sido usado no controlo de doenças como a varíola, a difteria, o tétano, o sarampo, entre outras (Lee *et al.*, 2014).

ii. Definição de vacina

As vacinas são preparações farmacológicas constituídas por substâncias imunogénicas capazes de induzir imunidade contra patogéneos (Alves *et al.*, 2007). Dividindo-se em dois tipos de imunizações, a imunização activa (constituída por antigénio capaz de

induzir respostas imunitárias) e a imunização passiva (transferência ou administração de anticorpos). (Suh *et al.*, 2014).

iii. Tipos de vacinas profiláticas tradicionais

O desenvolvimento de vacinas profiláticas de vírus foi um momento revolucionário para a saúde pública. Ao educar o sistema imunológico contra determinados antígenos, tornou-se possível modular uma resposta imunitária que suprime a proliferação do vírus no interior do corpo (Suh *et al.*, 2014).

a) Vacinas inactivadas

Vacinas de vírus inactivados são formulados com os vírus inactivos ou mortos, menos potentes que os atenuados mas mantêm a imunogenicidade suficiente para induzir uma resposta imune (Suh *et al.*, 2014). Estas vacinas consistem na inactivação do agente patogénico com formalina ou β -propiolactona e, posteriormente purificá-lo (Kang *et al.*, 2012).

A vantagem destas vacinas prende-se com a sua segurança uma vez que não há risco de multiplicação do agente patogénico no organismo não ocorrendo o risco de regressão, contudo, elas induzem uma imunidade menos duradoura levando a repetições de imunizações o que significa maior custo e menor taxa de adesão (Schatzmayr, 2003). Conferindo uma protecção essencialmente através da indução de células T CD4⁺ e de mecanismos humorais, não proporcionando uma resposta imunitária de longa duração (Ferraro *et al.*, 2011).

b) Vacinas vivas atenuadas

As vacinas de agentes patogénicos vivos atenuados são formas de microorganismos, geralmente activas, em que a sua virulência é comprometida o suficiente para evitar ocorrência da doença, mantendo a imunogenicidade (Suh *et al.*, 2014).

Uma forma de atenuação baseia-se na passagem de agentes patogénicos em células de diversos hospedeiros em condições de temperaturas diferentes obtendo desta forma agentes patogénicos menos virulentos (Schatzmayr, 2003).

Através do método de cultura à base de células foi possível a selecção de mutantes por isolamento de clones individuais, permitindo também a incubação a temperaturas inferiores à temperatura normal do hospedeiro (Sadanand, 2011).

A vantagem destas vacinas é o envolvimento de todos os componentes do sistema imunitário, obtendo uma resposta imunitária completa e de longa duração. A desvantagem destas vacinas é o facto de possibilitar efeitos adversos aquando da multiplicação no hospedeiro, tornando-as mais virulentas (Schatzmayr, 2003) como também o grau de atenuação puder induzir uma resposta imunitária baixa, quando por exemplo, o objectivo é atingir múltiplos subtipos virais ou patogéneos (Ferraro *et al.*, 2011).

Ambos os tipos de vacinas reduzem a infecção mediada pelo agente patogénico e limitam a replicação através da indução de anticorpos e de células de memória (Kaur *et al.*, 2011).

Estas vacinas têm sido bem sucedidas em casos de infecções agudas, pois neste caso elas imitam mais de perto a infecção natural. No entanto, para infecções crónicas provocadas por vírus como é o caso do HIV, HCV e HPV a infecção natural não é suficiente para eliminar a infecção, isto porque para estes vírus a resposta tem que ser mais eficaz tanto a nível quantitativo como qualitativo exigindo análise de um paradigma diferente à infecção natural. Existe uma preocupação elevada na utilização das vacinas atenuadas nestas situações devido a possibilidade de regressão. Contudo, o desafio nesta área é crescente, encaixa no desenvolvimento de novas estratégias de vacinas com capacidade para induzir uma boa resposta imunitária, talvez até melhor do que na infecção natural, tanto a nível das doenças infecciosas virais agudas mas principalmente nas doenças infecciosas virais crónicas (Berzofsky *et al.*, 2004).

II. Novas tecnologias de vacinas em desenvolvimento

1. Estratégias de produção de vacinas

Existem várias estratégias de produção de vacinas que serão de seguida descritas indicando para cada uma as suas potenciais vantagens e desvantagens.

i. Vacinas produzidas em ovo

As vacinas produzidas em ovos foram introduzidas na década de 1930. Foi iniciada a produção com alguns vírus como foi o caso do vírus da varíola e do vírus influenza (Schatzmayr, 2003). Estas vacinas exigem alguns meses de produção para se obter quantidades suficientes de antígeno devido à exigência de adaptação ao crescimento do vírus nos ovos, podendo atrasar a disponibilidade das vacinas (Ferraro *et al.*, 2011). Para além deste problema (tempo de produção/disponibilidade), existem outras limitações, como por exemplo, a necessidade de obter aves certificadas e a dificuldade de adaptação da estirpe do vírus para replicação eficiente no ovo (Singh *et al.*, 2010). Outra desvantagem consiste na contaminação dos ovos por outros agentes patogénicos difíceis de identificar, visto cada ovo ser um biorreactor, podendo desta forma não ser internamente estéril e a contra-indicação de administrar vacinas produzidas em ovos em pessoas alérgicas (Tang *et al.*, 2009).

Esta estratégia é muito vulnerável devido à escassez de ovos no caso de surtos zoonóticos de gripe aviária ou de outras doenças que possam afectar as galinhas, diminuindo desta forma a capacidade de produção (Lambert & Fauci, 2010).

Contudo, para o vírus influenza, são conhecidos dois tipos de vacinas contra a gripe que são produzidas em ovos embrionados como é o caso da vacina de influenza viva atenuada (LAIVs) e da vacina inactiva contra influenza (Singh *et al.*, 2010). São também produzidas em ovos, as vacinas contra a febre amarela, raiva e sarampo (Tabela 1) (Alves *et al.*, 2007).

Tabela 1 – Vacinas produzidas em ovos

(Adaptado de Alves *et al.*, 2007)

Vacinas virais	Meio de crescimento
Febre amarela	Embrião de galinha
Influenza	Líquido extra-embriônico de galinha
Raiva	Fibroblastos de embrião de galinha
Sarampo	Fibroblastos de embrião de galinha
Parotidite epidêmica	Fibroblastos de embrião de galinha

ii. Vacinas independentes do ovo

Devido às limitações existentes nas vacinas produzidas em ovos, foram desenvolvidas novas estratégias de produção. Um exemplo disso é a produção à base de cultura de células que permite o incremento do volume de vacinas produzidas (Singh *et al.*, 2010).

Apresentam um tempo de produção mais curto (entre um a três meses) comparando com as produzidas à base de ovos. São fabricadas em biorreactores fechados para desta forma reduzir a contaminação exógena (Pandey *et al.*, 2010).

A cultura celular é um método de produção fiável e flexível que permite o crescimento de uma ampla gama de estirpes de vírus (Chua & Chen, 2010). No entanto, apresentam algumas limitações tais como; o risco de contaminação da cultura das células por agentes adventícios; a exigência de novas instalações para produção; a instabilidade das células e, sobretudo, a dificuldade de identificar células adequadas para a produção de vacinas (Bernstein, 2010).

iii. Partículas semelhantes a vírus

As Partículas Semelhantes a Vírus (VLPs) são nanopartículas constituídas por cápsides proteicas desprovidas de material genético que as torna não infecciosas, no entanto

capazes de promover a interacção ligando-receptor, aumentando assim a resposta imunitária (López-Macías, 2012).

Podem ser produzidas a partir de um sistema de expressão de baculovírus e células de insectos e permitem a produção em grande escala (Singh *et al.*, 2010). Outra estratégia de produção de VLPs é através do sistema de expressão à base de plantas. Esta estratégia é bastante segura uma vez que não parece haver risco de infecções em humanos por agentes virais das plantas (Kang *et al.*, 2012). Produtos biológicos derivados de plantas permitem a produção em massa. Esta estratégia é vantajosa porque fornece medicamentos de baixo custo que não necessitam da cadeia a frio ajudando desta forma os países em desenvolvimento que têm pouco acesso à medicina moderna. Outra situação favorável é a remoção de genes que codificam o movimento dos vírus e/ou proteínas que impedem que estas passem de uma planta para a outra, reduzindo as preocupações da transmissão cruzada. Estão disponíveis dois métodos de inoculação, um deles é infectar a planta com o vector do vírus e o outro é inocular por agroinfiltração as plantas, isto é, através da incorporação do vector do vírus na bactéria *Agrobacterium tumefaciens* e infiltrando-o na folha através da seringa ou em vácuo. Existem vários vectores para expressão na planta. Os mais utilizados são o Vírus do Mosaico do Tabaco (TMV), Vírus Batata X (PVX), potexviruses e os Vírus Mosaico do Pepino (CMV) (Hefferon, 2014).

Esta estratégia não necessita de sistema de fermentação expansiva para geração de biomassa. Várias VLPs têm sido produzidas em plantas verificando-se resultados encorajadores (Chen & Lai, 2013).

As VLPs são então sintetizadas em células produtoras e libertadas onde ocorre a expressão simultânea de proteínas estruturais do vírus dando desta forma origem a partículas semelhantes a vírus por um processo de automontagem típico de um ciclo de vida viral que ocorre mesmo na ausência de material genómico (Kang *et al.*, 2012).

Em relação às vacinas tradicionais, as VLPs são extremamente seguras porque não há risco de erros de inactivação ou reversão de patogenicidade. São de produção simples e em massa, com elevado grau imunogénico, capazes de induzir elevados títulos de anticorpos neutralizantes. Esta elevada imunogenicidade é possível porque, uma vez que as VLPs permitem a multiplicação de epítomos repetitivos, possibilitam uma activação forte das células B e estimulam a imunidade mediada por células (Wang &

Roden, 2013). As VLPs podem ser produzidas tanto com ou sem invólucro (Kang *et al.*, 2012), e com capacidade de induzir uma boa resposta humoral e celular (Singh *et al.*, 2010).

Existem factores que aumentam a imunogenicidade das VLPs, tais como; a escolha da via de imunização; o tamanho das partículas; a geometria; a densidade de epítomos expressos na superfície e a sua farmacocinética e farmacodinâmica (López-Macías, 2012).

2. Novos tipos de vacinas

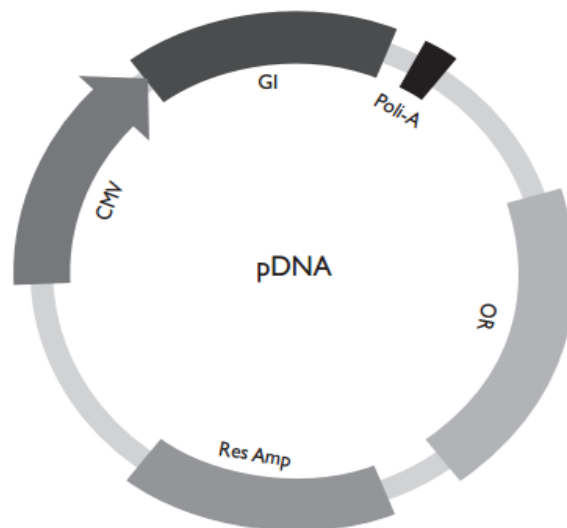
i. Vacinas de DNA

As vacinas de DNA são uma estratégia promissora para imunização contra uma diversidade de agentes patogênicos. Induzem potentes respostas imunes celulares e podem ser administradas repetidamente (Greenland & Letvin, 2007). Estas vacinas são seguras, estáveis e, relativamente fáceis de fabricar e manipular (Hutnick *et al.*, 2011). Não necessitam de cadeia fria como os outros tipos de vacinas porque estas vacinas são relativamente estáveis à temperatura (Sardesai & Weiner, 2011).

Uma vacina de DNA é constituída por um plasmídeo que contém uma origem de replicação de *Escherichia coli*, para amplificação do plasmídeo; um promotor forte; múltiplos locais de clonagem onde se pode inserir o gene a ser expresso e um antibiótico (Figura 1) (Nascimento & Leite, 2012).

Figura 1 – Representação esquemática do plasmídeo de DNA. Contém o promotor (CMV), adjacente ao gene que codifica o antígeno (GI), poli-adenilação (poli-A), gene que corresponde a resistência de antibióticos (Res) neste caso ampicilina (Amp) e origem da replicação na bactérias (OR)

(Adaptado de Mota-Sánchez, 2009)

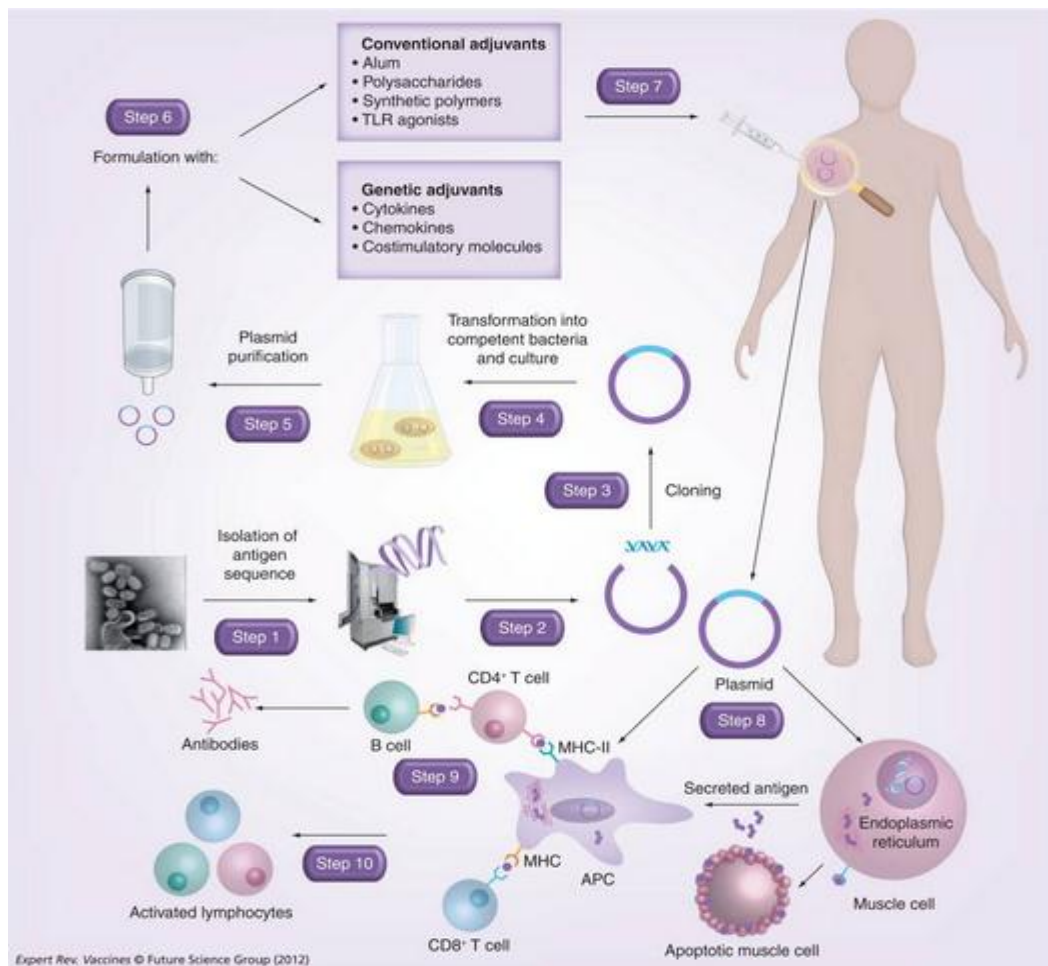


As vacinas de DNA geneticamente modificadas e expressas *in vivo*, têm como objectivo induzir a resposta imunitária contra os antígenos recombinantes codificados, imitando

as infecções virais naturais (Flingai *et al.*, 2013). O conceito é muito simples, quando inoculados com plasmídeos que transportam genes que são expressos em células transfectadas, ou seja, quando o DNA é injectado, penetra as membranas citoplasmáticas e nuclear, utiliza a maquinaria enzimática da célula necessário à transcrição e tradução, produzem o antigénio, apresentam ao exterior, gerando desta forma respostas imunológicas como é o caso dos anticorpos, que garantem a protecção contra patógenos que circulam na corrente sanguínea; das células citotóxicas, com o potencial de identificar e destruir células infectadas e das células de memória, que são fundamentais para um efeito profiláctico duradouro (Figura 2) (Diniz & Ferreira, 2010).

Figura 2 – Representação da preparação, entrega e produção de resposta das vacinas de DNA

(Adaptado de Saade & Petrovsky, 2012)



Nestas vacinas é possível a partir do plasmídeo incorporar vários genes, como também moléculas que podem modular ou estimular respostas imunitárias para aumentar a eficácia da vacina. Produzem respostas imunitárias humorais e celulares (Singh *et al.*, 2010). Conduzem a uma resposta imunitária completa, forte e duradoura (Geels & Ye, 2010).

O desenvolvimento e produção de plasmídeos de DNA é relativamente simples e de baixo custo. Têm elevada estabilidade e não necessitam de refrigeração, o que torna estas vacinas mais adequadas para produção em massa e distribuição a uma escala global, tanto ao nível dos países em desenvolvimento como dos desenvolvidos (Abdulhaqq & Weiner, 2008). Uma estratégia importante para melhorar a imunogenicidade da vacina DNA é aumentar a quantidade de entrega de plasmídeo às células para aumentar a expressão de antígeno (Hutnick *et al.*, 2011).

Para além desta melhoria, existem outros métodos para melhorar a eficácia das vacinas, como por exemplo; a inclusão de adjuvantes moleculares; a entrega das vacinas com eletroporação; estratégias prime-boost, melhorando assim a imunogenicidade (García-Sastre & Mena, 2013).

Outra estratégia é o encapsulamento de DNA em micropartículas ou utilização de vectores, como por exemplo vírus ou bactérias para proteger e facilitar a entrega de DNA em células específicas (Nascimento & Leite, 2012). São necessárias estas estratégias porque as vacinas de DNA induziam potentes respostas imunitárias em animais pequenos de laboratório contudo em humanos elas provaram ser menos potentes (Greenland & Letvin, 2007).

Outros aspectos importantes são; a localização; a duração; a magnitude da expressão de DNA, porque estas contribuem para uma melhor imunogenicidade, evitando assim a degradação do DNA e reforçando a sua absorção às células (Greenland & Letvin, 2007).

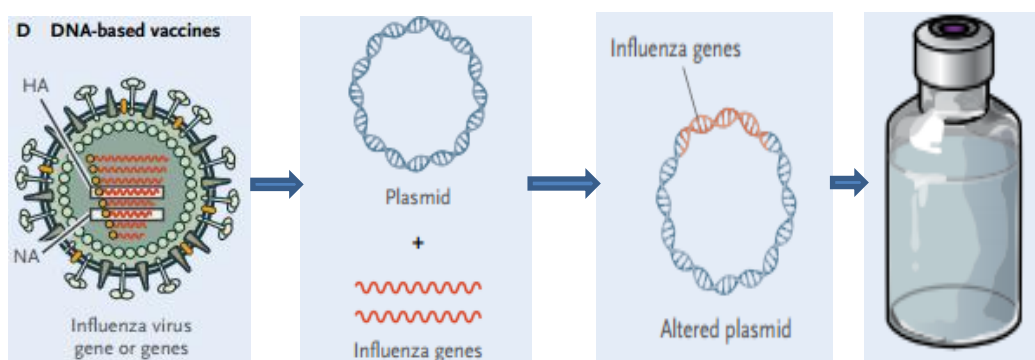
A adição de um adjuvante pode complementar as propriedades imunoestimulantes ou recrutar células imunitárias importantes para o local da inoculação. Pode aumentar a entrega de DNA e aumentar a duração, também pode melhorar a expressão do plasmídeo e pode proteger contra ADNases e degradação endocítica (Greenland & Letvin, 2007).

Vários adjuvantes para as vacinas de DNA foram testados, como por exemplo, sais de alumínio ou monofosforil-lípido A (MPL), mas o mais adequado são as citocinas que apresentam imunidade protectora nos humanos (Greenland & Letvin, 2007).

Estas vacinas são utilizadas para expressar antígenos de diferentes agentes patogénicos, como por exemplo; o vírus da gripe; HIV; malária; tuberculose, entre outros, originando a indução de respostas imunes contra esses agentes patogénicos em modelos animais e, em alguns casos, foi demonstrada protecção (Nascimento & Leite, 2012).

As vacinas de DNA estão a ser investigadas para usar em vacinas contra gripe pois podem expressar várias combinações de HA ou NA viral, bem como outros genes virais (Figura 3) (Ellebedy & Webby, 2009).

Figura 3 – Representação das vacinas de DNA para o vírus influenza (Adaptado de Lambert & Fauci, 2010)



Normalmente, são construídos plasmídeos com o gene de interesse (por exemplo, no vírus influenza o NP) sobre o controlo de um promotor eucariota (por exemplo CMV). Após a entrega da vacina, por injeção ou eletroporação, o gene é expresso em células. Depois as proteínas são sintetizadas no citoplasma das células e, após o seu processamento, os péptidos são gerados e apresentados às moléculas MHC classe I. Em ratinhos demonstrou induzir forte resposta de CTL (Hillaire *et al.*, 2011).

A seguinte tabela permite observar as diversas fases de desenvolvimento dos diferentes tipos de vacinas incluindo a vacina de DNA para o vírus influenza (Tabela 2).

Tabela 2 - Novas abordagens de produção de vacinas contra o vírus influenza e seus estados clínicos

(Adaptado de Lambert & Fauci, 2010)

Vaccine	Stage of Development			
	Preclinical Development	Phase 1 and 2 Clinical Testing	Phase 3 Clinical Testing	Licensed or Approved
Inactivated vaccines				
Egg-based	Yes	Yes	Yes	Yes
Cell-based	Yes	Yes	Yes	In Europe but not in the United States
With adjuvant	Yes	Yes	Yes	In Europe but not in the United States
Live attenuated vaccines				
Egg-based	Yes	Yes	Yes	Yes
Cell-based	Yes	Yes	No	No
Next generation				
Recombinant proteins	Yes	Yes	Yes	No
Viruslike particles	Yes	Yes	No	No
Viral vectors	Yes	Yes	No	No
DNA-based vaccines	Yes	Yes	No	No
Universal vaccines	Yes	Yes	No	No

A vacina de DNA para o HIV demonstrou uma boa capacidade de resposta imunitária quando combinada com outras técnicas (EP, adjuvantes, etc.) do que quando administrada sozinha (Abdulhaqq & Weiner, 2008).

ii. Vacinas baseadas em vectores virais

Nas vacinas baseadas em vectores são utilizados vírus ou bactérias atenuadas não patogénicas como vector para genes que codifiquem antigénios, estimulando tanto a imunidade humoral como a imunidade celular (Silva & Richtmann, 2006).

Estes vectores de vírus são manipulados para aumentar a segurança e a imunogenicidade com eliminação de factores de virulência, assim como, alterar o tropismo, substituindo proteínas do envelope e aumentar a capacidade de codificação, eliminando os genes que não são essenciais (García-Sastre & Mena, 2013).

Vacinas baseadas no vector de vírus são veículos utilizados para entrega do gene de interesse à célula hospedeira para a expressão (Singh *et al.*, 2010). Envolve a inserção

de material genético que codifica antígenos importantes no genoma de um vírus inofensivo resultando desta forma na geração de um vírus recombinante (Pandey *et al.*, 2010).

São capazes de entregar antígenos heterólogos pela introdução de genes codificadores de antígenos, utilizando a capacidade de infecção e as propriedades imunológicas do vector de vírus para induzir uma resposta imune contra as suas próprias proteínas bem como para a proteína heteróloga apresentada (Nascimento & Leite, 2012).

Estes vectores virais são activadores da imunidade inata sem risco associado a patogenicidade ou infecção e exercem um efeito de adjuvante. Podem ser produzidos a partir de culturas celulares em grandes quantidades (Singh *et al.*, 2010).

Tem a vantagem de ser inerente ao próprio agente patogénico, imitando uma infecção natural mas com a capacidade de estimular as células CD4⁺ e as CD8⁺, e com o benefício de ser administrada por via oral (Nascimento & Leite, 2012).

Existem algumas características que são desejáveis para um vector, tais como a capacidade de receber grandes fragmentos de genes estranhos, ser geneticamente estável, ser capaz de crescer em títulos elevados, permitir a purificação, a falta de persistência ou de integração no genoma do hospedeiro e não induzir doença ou toxicidade (Nascimento & Leite, 2012).

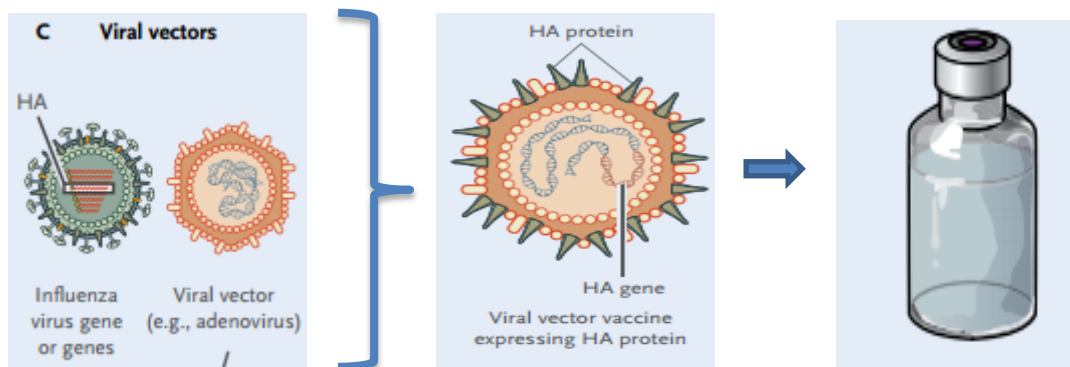
Há vários vectores virais que estão disponíveis para o desenvolvimento de vacina tais como o vírus vaccinia, o vírus vaccinia modificado Ankara (MVA), o adenovírus (Ad), o vírus adeno-associado (AAV), o lentivírus, o alfavírus, entre outros. Classificam-se de acordo com o tipo do virião (DNA ou RNA), tamanho da partícula, capacidade de transgene e o tropismo celular. Os vectores de vírus podem ou não replicar o vírus, sendo os de replicação deficiente os mais testados e os que conferem maior segurança. Contudo, os vectores replicantes são os mais propensos a induzir respostas fortes celulares e de mucosa, assim como anticorpos contra proteínas expressas (Nascimento & Leite, 2012).

Os adenovírus são vírus icosaédricos que contêm DNA de cadeia dupla, sem invólucro e podem infectar e replicar em diferentes locais do corpo como é o caso do trato respiratório e bexiga. Existem vários tipos de adenovírus mas o mais utilizado é o adenovírus serotipo 5 (Ad5) que é um vírus não replicante e estável, sendo considerado

um vírus mais seguro (Nascimento & Leite, 2012). Crescem em títulos elevados em cultura de células e não têm a capacidade de se integrar no genoma do hospedeiro (Pandey *et al.*, 2010). Os adenovírus recombinantes são incapazes de se replicar nas células humanas, codificam um ou mais genes de interesse, como por exemplo no vírus influenza HA, NP e os genes M1 (Figura 4) (Hillaire *et al.*, 2011).

Figura 4 – Representação das vacinas de vector viral para o vírus influenza

(Adaptado de Lambert & Fauci, 2010)



Um estudo realizado com 24 indivíduos saudáveis evidenciou que vacinas de Ad5 baseado H5N1 expressando HA administradas via intranasal no regime de duas doses, resultou num aumento de quatro vezes os anticorpos neutralizantes em 83% dos sujeitos. Contudo, estas vacinas necessitam de ser exaustivamente testadas em ensaios clínicos envolvendo indivíduos de diferentes faixas etárias e estados de saúde (Pandey *et al.*, 2010).

No HCV, os vectores de adenovírus demonstram ser potentes indutores de resposta de células T no modelo chimpanzé (Halliday *et al.*, 2011).

Outro vector vírus utilizado é o vírus vaccinia modificado Ankara (MVA), estirpe de Poxvírus. Estes são os maiores vírus conhecidos e são membros da família *Poxviridae*. Este vector foi utilizado com sucesso para erradicar a varíola, sendo imunogénicos com capacidade de acomodar várias inserções de genes (Pandey *et al.*, 2010). Semelhante ao Ad5, tem sido testado para o desenvolvimento de vacinas contra o HIV, tuberculose e

outras infecções. O MVA é incapaz de se replicar em células de mamíferos, e estes vectores têm demonstrado ser imunogénicos e protectores contra vários agentes infecciosos, como são os casos do HIV, tuberculose e malária. Contudo, esta vacina sozinha é pouco imunogénica, mas associada a outras estratégias torna-se uma técnica promissora. Utilizando, por exemplo, a estratégia prime-boost heteróloga, usando primeiro imunização com vector viral e depois imunização com proteína recombinante ou vacinas bacterianas vivas (Nascimento & Leite, 2012).

Para o HPV, os vectores virais que são capazes de se replicar nos hospedeiros, são os vectores que são capazes de gerar um resposta humoral e celular fortes e são altamente imunogénicos. Contudo, há questões que precisam ser consideradas como é o caso da segurança dessas vacinas (Lin *et al.*, 2011).

iii. Vacinas baseadas em proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes são produzidas através de sistemas de expressão de proteína comum, tais como bactérias, leveduras e baculovírus (Geels & Ye, 2010). Sendo que, os sistemas de expressão bacterianos são os mais utilizados porque são facilmente manuseados e a sua capacidade de expressão é alta. Vários genes destes agentes patogénicos supracitados foram clonados, expressos e purificados para serem testados como vacinas, sendo estas eficazes. Estas vacinas recombinantes dependem da aptidão de um ou vários antigénios inicialmente definidos para induzir a imunidade contra o agente patogénico em questão. Estas vacinas permitem a prevenção de várias situações provocadas por vacinas com base em macromoléculas purificadas, como por exemplo o risco de co-purificação de contaminantes indesejáveis ou situações de reversão de toxóide às suas formas toxinogénicas (Nascimento & Leite, 2012).

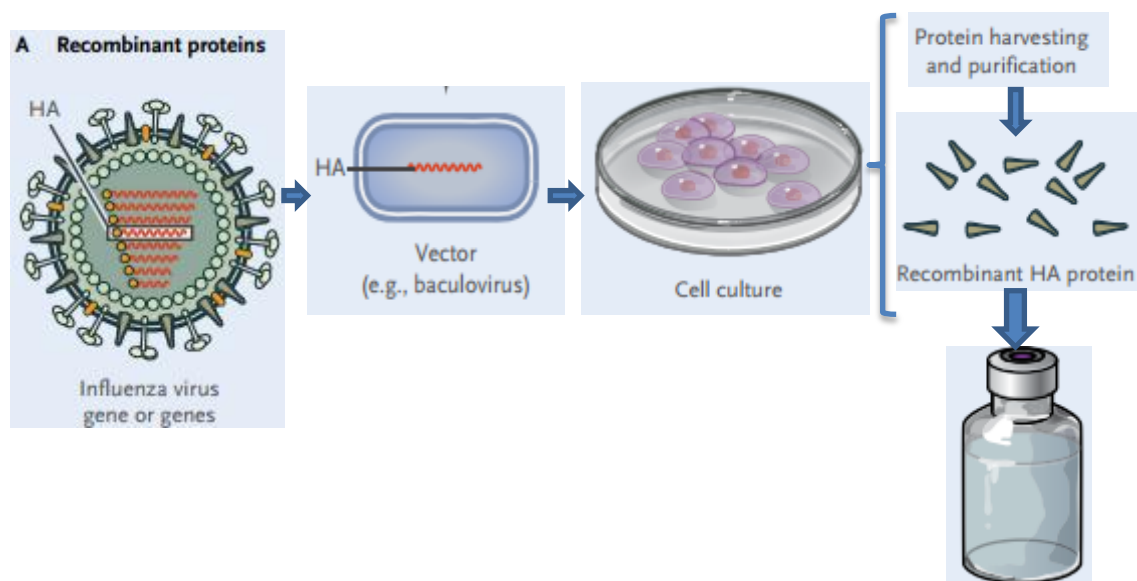
Estas vacinas apresentam algumas vantagens, tais como a não manipulação do agente patogénico durante a produção, evitando desta forma o risco de fuga acidental, e podem ser produzidas mesmo quando há pouca informação do agente patogénico (García-Sastre & Mena, 2013). Apresentam também, benefícios de segurança e custo de produção (Nascimento & Leite, 2012).

Um exemplo actual das vacinas baseadas em proteínas recombinantes é a vacina contra a hepatite B, que é produzida através da expressão do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) em células de levedura e o HBsAg reúne em VLPs, tornando a vacina mais eficaz. No sistema de expressão é segregado o antígeno para o sobrenadante da cultura, facilitando a purificação. Outro exemplo desta estratégia actualmente utilizada é a vacina contra o HPV. Existem duas vacinas em utilização desenvolvidas com base em VLPs utilizando as proteínas recombinantes L1 de cada subtipo de HPV, produzidas quer em leveduras como em sistemas de células de insectos. A proteína L1 é a principal proteína que se encontra na cápside do vírus e a sua expressão *in vitro* resulta da montagem de VLPs. O sucesso da utilização destas vacinas baseadas em proteínas recombinantes para a hepatite B, e a actual vacina contra o HPV, deve-se ao uso de sal de alumínio como adjuvante (Nascimento & Leite, 2012).

Uma vacina de proteína recombinante HA obtida através do sistema de expressão de baculovírus foi eficaz contra a gripe (Chua & Chen, 2010). Quando as estirpes do vírus influenza são seleccionados, os genes que codificam as proteínas de HA são clonados em vectores de baculovírus, expressam proteínas HA, que posteriormente serão purificadas e formuladas numa vacina (Figura 5) (Lambert & Fauci, 2010).

Figura 5 – Representação das vacinas de proteínas recombinantes para o vírus influenza

(Adaptado de Lambert & Fauci, 2010)



Estas vacinas baseadas em proteínas recombinantes têm sido usadas para induzir anticorpos contra o vírus influenza A. Uma vacina de proteína recombinante contendo

domínio extracelular altamente conservado, M2, demonstrou segurança e imunogenicidade num ensaio de Fase I (García-Sastre & Mena, 2013).

iv. Vacinas baseadas em péptidos

Vacinas à base de péptidos são constituídas por fragmentos imunogénicos de proteínas virais obtidas a partir do laboratório (Silva & Richtmann, 2006). São vacinas bem toleradas e induzem imunidade de células T (Halliday *et al.*, 2011).

Estas vacinas induzem uma resposta específica porque o péptido é apresentado pelas moléculas de MHC às células T CD4⁺ e T CD8⁺, desta forma, é uma das vantagens destas vacinas relativamente às outras. Contudo, um importante requisito para a indução destas células é a existência de células T disponíveis para reconhecer o péptido (Huber *et al.* 2014).

O MHC representa o conjunto de genes responsáveis por codificar as moléculas HLA (Fernandes *et al.* 2003). A afinidade da ligação dos péptidos ao MHC é igualmente importante para a imunogenicidade (Huber *et al.* 2014). Isto porque as vacinas baseadas em péptido são de MHC limitado, ou seja, o péptido pode não ser capaz de induzir imunidade mediada por células em indivíduos com diferentes moléculas de MHC-I. (Lin *et al.*, 2011). A limitação do MHC resulta na necessidade de identificar epítomos imunogénicos correspondentes às moléculas de MHC polimórficas na população. Porém, péptidos longos sobrepostos poderão contornar esta limitação de MHC (Ma *et al.* 2012).

Para o HPV a administração de péptidos derivados de antígenos de HPV, ocorre com a absorção do péptido pelas células dendríticas para o processamento da apresentação de antígenos que posteriormente activa a imunidade das células T específicas do antígeno (Ma *et al.*, 2012). Estas vacinas demonstraram ser estáveis, seguras e de fácil produção. Contudo, têm fraca imunogenicidade, desta forma necessitam, por exemplo, de adjuvantes (Lin *et al.*, 2011).

Devido ao sucesso destas vacinas para o HPV, outros grupos de vírus estão sendo estudados. Por exemplo, para HCV estas vacinas baseadas em péptidos demonstraram uma diminuição de títulos virais (Huber *et al.* 2014).

Induziram imunidade das células T através da apresentação do péptido ao receptor das células T através da molécula HLA. Contudo devido a limitação dos péptidos que são específicos de HLA há a restrição de um subconjunto de população (Halliday *et al.*, 2011).

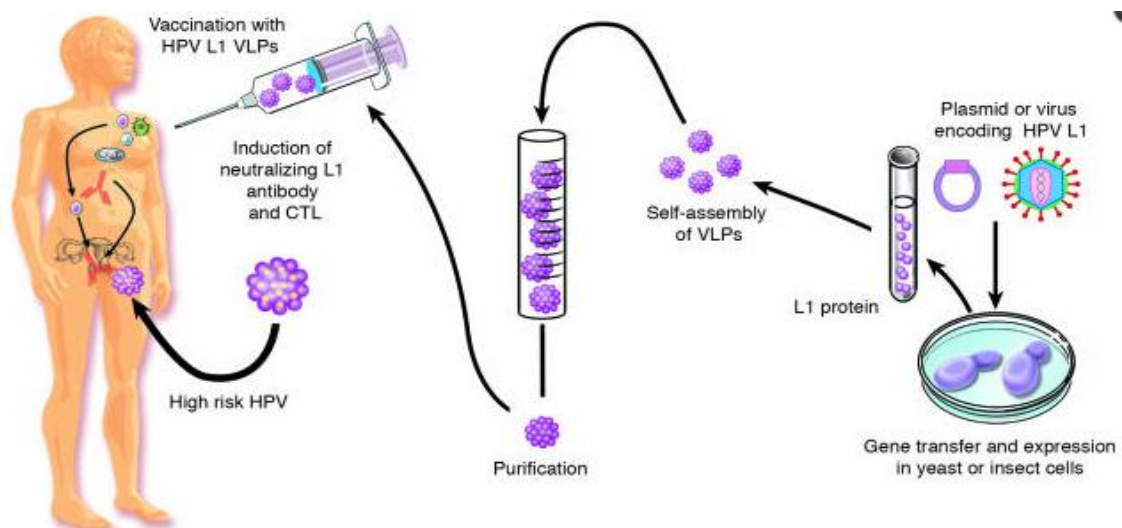
Ao desenvolver estas vacinas tem que se ter em conta; os efeitos colaterais; o local de resposta; o vírus e, o hospedeiro. Perante as vacinas preventivas, estas devem desencadear respostas das células T memória, para responder rapidamente à infecção e eliminar o vírus antes que cause a doença. Perante as vacinas terapêuticas, a resposta deve ser vigorosa e alongada. Alguns adjuvantes são utilizados para formação de um depósito no tecido (para obter imunidade de longa duração e sustentada), outros são usados para estimular directamente a resposta imune através de sinais adicionais (Huber *et al.* 2014).

v. Vacinas baseadas em VLPs

Existem dois tipos de VLPs, as com invólucro e as sem invólucro. No HPV as vacinas baseadas em VLPs são sem invólucro. A expressão da proteína principal da cápside L1 resultou na produção de VLP (Figura 6) (Kang *et al.* 2009).

Figura 6 – Representação da expressão da proteína da cápside L1 na produção de VLPs

(Adaptado de Saade & Petrovsky, 2012)



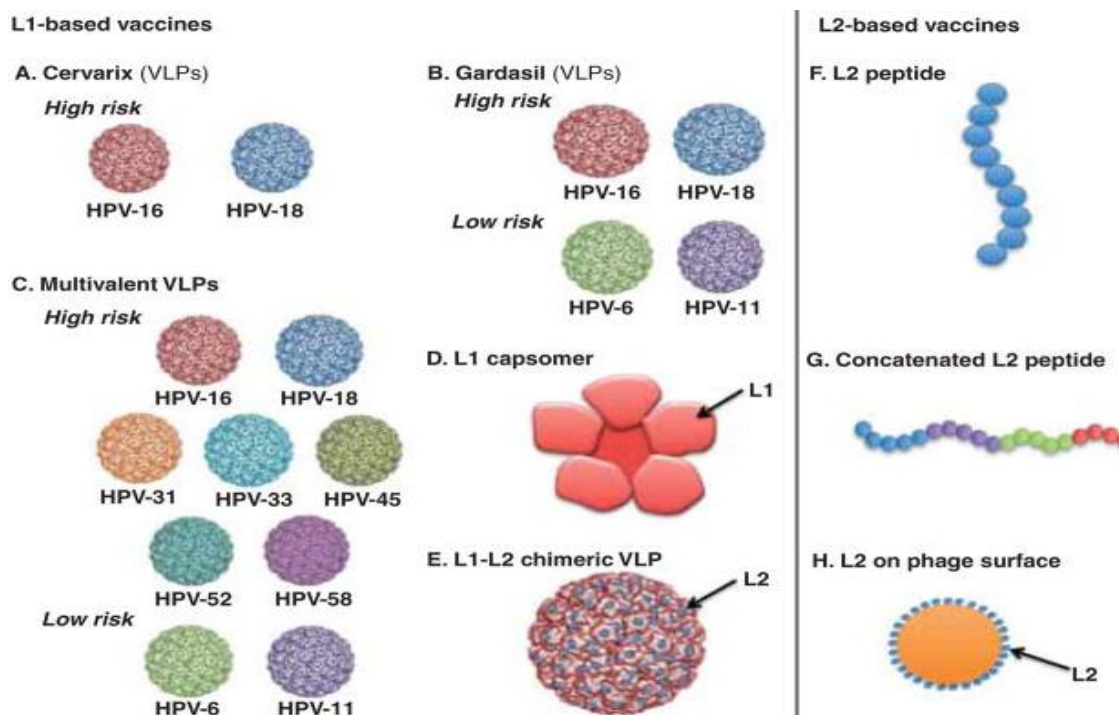
Já as VLPs com invólucro lipídico têm um processamento mais difícil devido à sua complexidade. Um exemplo de VLPs com invólucro é a vacina da hepatite B que vem sendo utilizada há mais de uma década. O vírus influenza também é produzido com invólucro e demonstrou imunidade protectora em estudos animais. Os animais que foram vacinados com as VLPS contendo HA, ou HA e NA foram protegidos da morbidade e mortalidade resultantes de infecções de gripe (Kang *et al.* 2009).

As VLPs são produzidas em células de levedura ou de insecto. No caso do HPV são formadas através da expressão de L1 isoladamente ou de L1 e L2, onde exibem similaridade estrutural antigénica no virião e pode induzir títulos elevados de anticorpos em pessoas vacinadas. Estas vacinas profilácticas são extremamente eficazes, no entanto apresentam algumas limitações, tais com a necessidade de refrigeração na distribuição, custo elevado e só são eficazes contra o tipo de HPV presente na vacina (Campo & Roden, 2010).

Já foram licenciadas duas vacinas contra o HPV baseadas em VLP: a Gardasil produzida a partir de leveduras e a Cervarix produzida a partir de células de insecto. Estas vacinas são eficazes em proteger indivíduos saudáveis de novas infecções por, pelo menos, uma década. Em ambas as vacinas a proteína da cápside L1 é capaz de se auto-montar e de formar VLPs imunogénicas, capazes de induzir elevados títulos de anticorpos neutralizantes. Oferecem protecção limitada de acordo com o tipo. Novas estratégias estão em desenvolvimento para a produção de vacinas contra o HPV, mais acessíveis e que abrangem uma cobertura mais ampla, abordando vários tipos de HPV. A próxima geração de vacinas contra o HPV irá ter em conta os custos de produção, a duração, eficácia e protecção, procurando uma protecção mais ampla contra este vírus (Figura 7) (Ma *et al.*, 2012).

Figura 7 – Representação da próxima geração de vacinas contra o HPV

(Adaptado de Ma *et al.*, 2012)

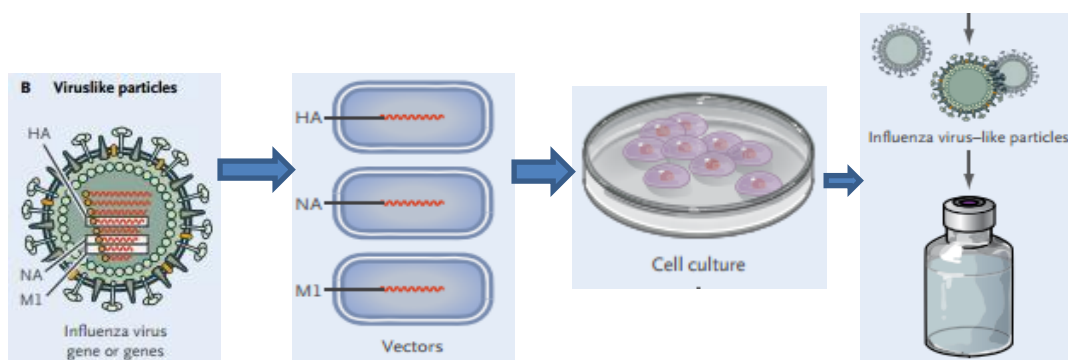


As vacinas multivalentes têm como intuito gerar uma proteção mais ampla. Contudo, há vários parâmetros que ainda têm que ser analisados e estudados. Será necessário encontrar uma dose certa de cada tipo HPV para a vacina. As vacinas capsídeo L1 são vacinas mais rentáveis e uma alternativa das VLPS L1 uma vez que as actuais precisam de 360 cópias de proteína L1 enquanto para a nova vacina apenas são necessários cinco monómeros de L1, permitindo uma elevada redução de custos. As vacinas L2 são promissoras. A L2 é uma proteína altamente conservada entre os diferentes tipos de HPV protegendo contra um alto espectro dos vários tipos HPV e de baixo custo pois a produção de L2 pode ser feita a partir a *E. coli*. Porém, tem fraca imunogenicidade. No entanto estão a ser estudados vários tipos de adjuvantes a adicionar à vacina para testar em novos ensaios clínicos. Nas vacinas VLP quiméricas a vantagem é a ampla proteção cruzada da combinação de L1 com L2 gerando uma resposta mais imunogénica (Ma *et al.*, 2012).

No HCV a produção de partículas é realizada em células de insecto e envolve a utilização de um baculovírus recombinante contendo uma cadeia de DNA (cDNA) que codifica as proteínas estruturais do HCV (Walker & Burton, 2010).

No vírus da gripe, as VLPs também podem ser produzidas com proteínas do vírus pelo processo de auto-montagem incorporando proteínas estruturais relevantes. São produzidas em células de insectos infectados com baculovírus recombinantes que transportam HA, NA e M1 produzindo desta forma VLP (López-Macías, 2012). VLPs do vírus influenza expressam simultaneamente HA e NA, juntamente com a proteína M1, são imunogénicas e protectoras relativamente ao vírus da gripe (Figura 8) (Chua & Chen, 2010).

Figura 8 – Representação das vacinas de VLPs para o vírus influenza
(Adaptado de Lambert & Fauci, 2010)



vi. Vacina Universal

O objectivo da vacina universal é fornecer protecção estável, ampla e duradoura contra todas as estirpes do vírus da gripe, reduzindo a necessidade de vacinação anual (Chua & Chen, 2010).

Enumeras estratégias de desenvolvimento baseiam-se no aumento da resposta imune contra proteínas que são altamente conservadas em todas as estirpes do vírus influenza (Gomez Lorenzo & Fenton, 2013) uma vez que estes vírus estão sempre em constante mutação (particularmente na glicoproteína de superfície HA - proteína de superfície responsável pela ligação do vírus aos receptores), que advêm de mutações pontuais no genoma de RNA viral e que são responsáveis pelo surgimento de novas estirpes responsáveis pelas epidemias sazonais. O que se pretende com a nova tecnologia é utilizar como alvos, os antígenos altamente conservados de forma a produzir uma imunidade duradoura e estável (Lee *et al.*, 2014).

Estas vacinas incluem a proteína de matriz 2 (M2), a base da glicoproteína HA e antígenos multivalentes baseados em células T (Tabela 3) (Lee *et al.*, 2014).

Tabela 3 – Alvos antigénicos para as vacinas contra gripe universal

(Adaptado de Lee *et al.*, 2014)

Viral protein	Targeted site	Proposed mechanism(s) of protection
Hemagglutinin (HA1)	Receptor binding globular head domain	Strain specific neutralizing antibodies block the virus entry; weak cellular immunity
Hemagglutinin (HA2)	Stalk domain with fusion activity	(Non-neutralizing) antibodies, inhibition of fusion, maturation of the HA, and antibody dependent cell-mediated cytotoxicity
Matrix 2 ion channel (M2)	Ectodomain of M2 (M2e)	Non-neutralizing antibodies, alveolar macrophages, Fc receptor, antibody dependent natural killer cell activity, complement mediated lysis, antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, CD4 and CD8 T cell mediated protection
Nucleoprotein (NP)	T-cell epitopes	Cell lysis by CD8 ⁺ cytotoxic T-lymphocytes (CTL), CD4 ⁺ T lymphocyte mediated cytotoxicity
Neuraminidase (NA)	Conserved sialidase active site	Non-neutralizing antibodies, Inhibition of virus release, virus spread
Matrix (M1)	T-cell epitopes	Cell lysis by CD8 ⁺ CTL, CD4 ⁺ T lymphocyte mediated cytotoxicity

O domínio extracelular de M2 é altamente conservada entre os vários vírus influenza A, o que indica que é um alvo atraente para o desenvolvimento da vacina universal (Kang *et al.* 2011).

A proteína (M2) é um canal de iões transmembranar e estudos demonstram que em configurações apropriadas ela demonstra ser protectora (Ellebedy & Webby, 2009).

A imunidade baseada em M2 é permissiva para a infecção por influenza, contudo, podem reduzir mas não eliminar os sintomas da doença, podendo diminuir a morbidade e mortalidade. Todavia, a vacina com proteína M2 combinada com um adjuvante (IFA) demonstrou protecção cruzada nos ratinhos, diminuindo os títulos virais nos pulmões e a morbidade. Vacinas baseadas em péptidos (M2) combinados com adjuvantes apresentaram protecção contra a infecção letal. Estas vacinas candidatas à vacina universal estudadas em modelos animais ainda não atingiram o nível de protecção oferecido pelas vacinas inactivas actuais. Contudo, são potenciais candidatas para infecção e podem diminuir (mas não eliminar) os sintomas da doença. Vacinas com VLP M2 foram utilizados em ratos e demonstraram protecção contra a infecção letal com diferentes subtipos do vírus influenza A. Permitiram uma boa resposta imunológica assim como aumentaram a imunogenicidade e a sua estabilidade. Recentemente demonstrou-se que a combinação de uma vacina inactivada contra o vírus influenza com VLPs M2 evita sintomas da doença sem a perda de peso, conferindo protecção. Logo, a combinação das vacinas da gripe com VLPs M2 supera a limitação da protecção

específica das vacinas actuais. São necessárias ensaios clínicos da eficácia M2 e/ou outras potenciais vacinas universais para ser possível desenvolver uma vacina universal eficaz para uso humano (Kang *et al.* 2011).

Outra proteína potencial para vacina universal é a proteína HA. É uma molécula que consiste em glicoproteínas ligadas por ligações dissulfureto, com uma cabeça globular HA1 e um domínio haste composta por parte de HA1 e HA2. A clivagem mediada por proteases é necessária para a fusão e replicação do vírus. Contudo, o sítio da clivagem HA é altamente conservada na maioria dos vírus influenza A, sendo acessível ao anticorpo. Os potenciais anticorpos protectores dirigidos para a região de junção HA1/HA2 foi explorada utilizando péptidos sintéticos, e demonstrou-se que os ratos vacinados apresentavam menos doenças e diminuição das taxas de morte, protegendo-os num largo espectro de estirpes do vírus. A subunidade HA2 do vírus influenza é mais conservada comparativamente com HA1. Contudo, as respostas imunitárias para o domínio HA2 são mais fracas, provavelmente devido à cabeça globular volumosa do domínio HA1. No entanto, ensaios clínicos da hemaglutinina sem uma porção da cabeça globular demonstraram protecção conferida em ratos. Contudo, ainda são necessários mais estudos para ser possível suportar um novo conceito de vacina universal com base no domínio HA2, uma vez que estas vacinas são susceptíveis de mostrar protecção cruzada. A proteína M2 e o domínio HA2 têm sido amplamente estudados como potenciais alvos para o desenvolvimento da vacina universal (Lee *et al.* 2014).

3. Incremento de eficácia das vacinas

A capacidade de produção pode ser aumentada com o método baseado em cultura de células ou VLPs. No entanto, a disponibilidade da vacina pode ser melhorada aumentando a sua eficácia (Lambert & Fauci, 2010). Contudo, para obter vacinas eficazes é necessário a combinações de diversas estratégias como é o caso de diferentes sistemas de entrega ou adjuvantes (entre outras) de forma a apresentar o antigénio de modo a que possa desencadear uma resposta imunitária mais eficaz e adequada (Nascimento & Leite 2012).

i. Adjuvantes

O objectivo da vacinação é gerar um aumento da resposta imunitária contra o antigénio administrado, capaz de proporcionar uma protecção de longo prazo (Petrovsky & Aguilar 2004). No entanto, a baixa imunogenicidade das vacinas é um grande obstáculo na resposta rápida a um vírus. Por vezes são necessárias doses mais elevadas de antigénio, o que significa que quanto maior a quantidade maior é o tempo de produção (Ellebedy & Webby, 2009).

Os adjuvantes são então utilizados para aumentar a imunogenicidade das vacinas, amplificar a resposta imune a um antigénio, aumentar a entrega e sua apresentação, bem como recrutar as células inflamatórias e imunocompetentes (Lambert & Fauci, 2010).

A selecção de adjuvantes está relacionada com os antigénios envolvidos na espécie a ser vacinada, na via de administração e, na probabilidade dos efeitos adversos. As características dos adjuvantes devem ser; estáveis; biodegradáveis; de baixo custo; não induzir respostas imunes contra si; promover uma resposta imune adequado (Petrovsky & Aguilar, 2004). Têm sido utilizados como adjuvantes; emulsões sintéticas (emulsões óleo em água); alumínio; formulações lipídicas; adjuvantes moleculares (citocinas e quimiocinas) (Geels & Ye, 2010).

O alumínio tem sido usado há mais de 70 anos e é o adjuvante mais utilizado devido à sua segurança uma vez que é bem tolerado pelo organismo (Lee *et al.*, 2014). Este adjuvante aumenta a eficácia das vacinas, permitindo o aumento da exposição do

antigénio devido à sua libertação longa no local da injeccção (Geels & Ye 2010). Isto ocorre porque o alumínio adsorve o antigénio da vacina e faz com que o antigénio fique mais tempo no local da injeccção, desta forma a imunogenicidade do antigénio aumenta (Lee *et al.*, 2014).

MF59 ou emulsão óleo em água permite aumentar a absorção pelas células apresentadoras antigénios (APCs) (Geels & Ye, 2010). É constituído por esqualeno, polissorbato 80, trioleato de sorbitano, citrato trisódico desidratado, ácido cítrico monohidratado e água (Lee *et al.*, 2014). Permite a formação de um depósito no local da injeccção, que possibilita a lenta libertação de antigénio e a estimulação de células produtoras de anticorpos (Petrovsky & Aguilar, 2004).

ASO3 (uma forma modificada de MF59) é uma emulsão óleo em água com tocoferol (Lee *et al.*, 2014).

As formulações lipídicas, isto é, os lipossomas são constituídas por esferas lipídicas que encapsulam antigénios e funcionam como veículos de entrega das vacinas. Os lipossomas dependem do número de camadas lipídicas, da carga eléctrica, da composição e do método de preparação. Asseguram uma maior exposição do antigénio às células apresentadoras de antigénios, melhorando a imunidade humoral e celular (Petrovsky & Aguilar, 2004). Por exemplo, nas vacinas de DNA faz-se a encapsulação do DNA nos lipossomas, facilitando desta forma a entrada de DNA nas células, penetrando a bicamada lipídica da membrana celular de forma a que não ocorra degradação DNA pelas proteínas do soro (Saade & Petrovsky, 2012).

Os adjuvantes moleculares centram-se nas moléculas de citocinas e quimiocinas (Hutnick *et al.*, 2013). O Interferão (IFN- γ) é uma citocina pleiotrópica capaz de aumentar as respostas imunes celulares através de uma variedade de mecanismos. O factor estimulante de colónias granulócitos e macrófagos (GM-CSF) aumentam a resposta imunitária primária gerando a activação e recrutamento das células apresentadoras de antigénios. As citocinas são especialmente utilizadas nas vacinas de DNA pois podem ser expressos pelo mesmo vector que o antigénio (Petrovsky & Aguilar, 2004). Posto isto, os adjuvantes moleculares de citocinas podem ser classificados através do Th1 e Th2. Os adjuvantes Th1 incluem IL-2, IFN- γ , IL-12 e IL-15, estas aumentam a resposta da imunidade celular. Enquanto os adjuvantes Th2

incluem GM-CSF, IL-1, IL-4 levam ao aumento da imunidade humoral (Tabela 4) (Hutnick *et al.*, 2013).

Tabela 4 – Vários tipos de adjuvantes moleculares e as respostas que induzem (Adaptado de Abdulhaqq & Weiner, 2008)

Molecular adjuvant	Type	Animal model(s)	Adjuvant effect
RANTES	Chemokine	Mice	Cellular
MIP-1a	Chemokine	Mice	Humoral
IL-8	Chemokine	Mice	Cellular/humoral
SDF-1	Chemokine	Mice	Cellular
MCP-1	Chemokine	Mice	Humoral
IL-2	Cytokine	Mice	Cellular/humoral
IL-4	Cytokine	Mice, nonhuman primates	Humoral
IL-7	Cytokine	Mice	Cellular/humoral
IL-10	Cytokine	Mice	Cellular
IL-12	Cytokine	Mice, nonhuman primates	Cellular
IL-15	Cytokine	Mice, nonhuman primates	Cellular
IL-18	Cytokine	Mice, nonhuman primates	Cellular
M-CSF	Cytokine	Mice	Cellular
GM-CSF	Cytokine	Mice	Humoral
IFN-g	Cytokine	Mice, nonhuman primates	Cellular
ICAM-1	Co-Stimulatory	Mice	Cellular
CD40L	Co-Stimulatory	Mice	Cellular
CD80/86	Co-Stimulatory	Mice, nonhuman primates	Cellular

Os adjuvantes de quimiocinas são moléculas que controlam os linfócitos e encaminha-os para locais de inflamação. Através destes adjuvantes é possível modular a magnitude e características de DNA à imunidade da mucosa induzida pela vacina (Hutnick *et al.*, 2013).

Novas formulações de adjuvantes têm sido testadas para misturar dois ou mais adjuvantes, ou seja, combinar os mecanismos de acção, aumentando desta forma a potência e a resposta imunitária (Petrovsky & Aguilar, 2004).

Vários adjuvantes foram aprovados, sendo que, para a vacina da gripe os mais utilizados são as emulsões de óleo em água, que estimulam níveis elevados de anticorpos contra os vírus (Lambert & Fauci, 2010).

As principais dificuldades no desenvolvimento de novos adjuvantes para uso humano operam no que concerne à compreensão da sua complexidade molecular e os mecanismos pelos quais estimulam ou induzem a resposta imune (Nascimento & Leite, 2012).

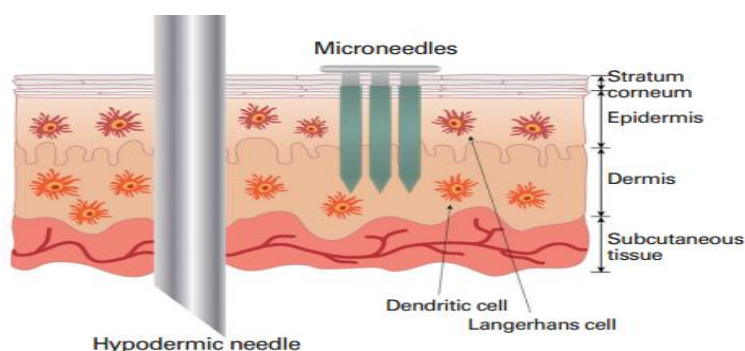
ii. Vias de imunização

As vias de imunização são estratégias importantes, pois aumentam a imunogenicidade das vacinas no acto da entrega. Cada via de administração tem as suas vantagens e limitações (Geels & Ye, 2010).

a) Via transdérmica

A administração pela via transdérmica é vantajosa, isto é devido aos benefícios da pele porque abaixo do estrato córneo há uma rede densa de células apresentadoras de antígenos representadas de forma mais significativa pelas células de Langerhans como também apresentando células dendríticas. As microagulhas têm sido uma estratégia utilizada para aumentar a eficácia da vacinação, porque estas atingem as células apresentadoras de antígenos na derme e na epiderme, as camadas inferiores da pele (Figura 9) (Suh *et al.*, 2014).

Figura 9 – Comparação entre uma injeção intramuscular e entre microagulhas (Adaptado de Suh *et al.*, 2014)

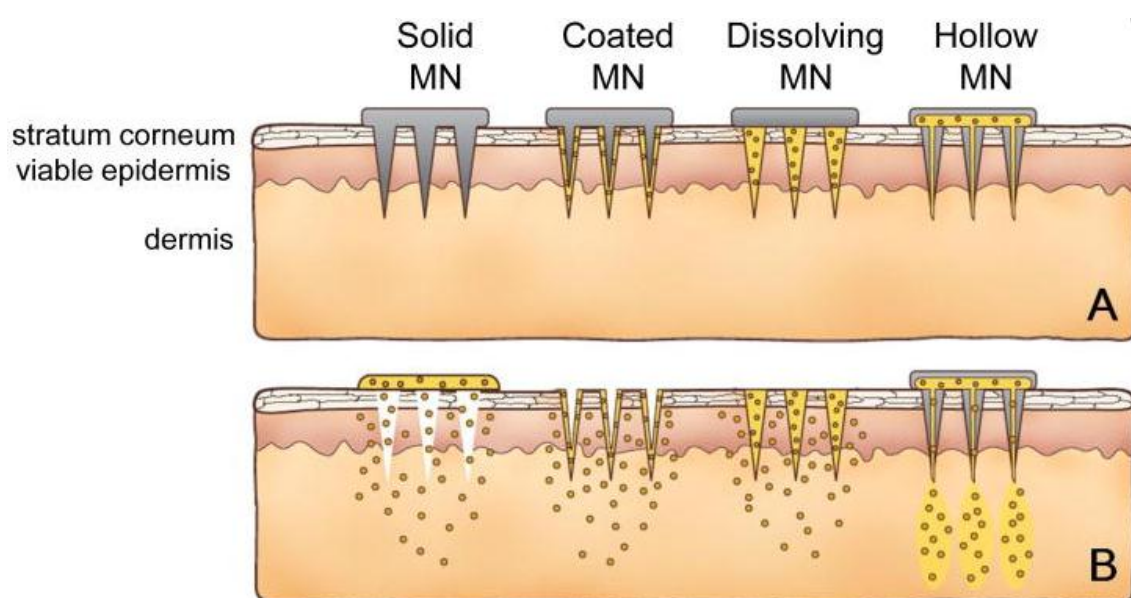


Esta tecnologia é constituída por agulhas microscópicas e por formulações farmacêuticas adequadas que penetram no estrato córneo, numa direcção perpendicular à pele e são isentas de dor. O surgimento das vacinas microagulhas não estarão dependentes da cadeia de frio e não requer a administração por pessoal qualificado (Suh *et al.*, 2014).

Existem quatro tipos de microagulhas em desenvolvimento; as contínuas; revestidas; de dissolução; ocas. As microagulhas contínuas (ou sólidas) levam à formação de um orifício no estrato córneo e quando se dá a remoção é colocado um adesivo que contém a formulação farmacêutica facilitando a passagem. As microagulhas revestidas encontram-se revestidas por formulações farmacêuticas que após a sua penetração na pele se dissolvem. Microagulhas de dissolução são constituídas por polímeros contendo as formulações farmacêuticas encapsuladas que se dissolvem permitindo a libertação dos antígenos na pele. Por último, as microagulhas ocas permitem a injeção de solução contendo a formulação desejável após a sua penetração no estrato córneo (Figura 10) (Kim *et al.*, 2012).

Figura 10 – Diferentes tipos de microagulhas

(Adaptado de Kim *et al.*, 2012)



b) Via nasal

A via nasal é uma via de administração muito atractiva por várias razões. Esta via de imunização não requer a utilização de agulhas o que de facto é uma vantagem para aquelas pessoas que têm fobia de agulhas, e também pelo facto de que a reutilização de agulhas pode levar à transmissão de doenças. Outra vantagem é que a imunização nasal tem a capacidade de induzir imunidade específica para o antigénio tanto a nível sistémico como a nível da mucosa. A indução da imunidade pela mucosa para o antigénio específico proporciona protecção contra organismos patogénicos que o primeiro contacto seja a superfície da mucosa, como por exemplo o vírus influenza, HPV, entre outros (Staats & Thompson, 2011).

c) Via oral

A imunização por via oral a partir de plantas comestíveis secas ou frescas que não necessitam de refrigeração contínua, podendo estar à temperatura ambiente, são óptimas para o transporte, distribuição e armazenamento, servindo como um bom veículo de entrega para as vacinas. A aplicação desta estratégia para vacinas baseadas em VLPs produzidas a partir de plantas comestíveis é muito promissora para estabelecer imunidade na mucosa do intestino que poderá ser utilizada, por exemplo, para o rotavírus causador da diarreia na infância. Este tipo de estratégia tanto poderá ser utilizado para produção como para vacinas de plantas comestíveis, estratégia muito promissora e flexível, para desta forma reduzir o tempo de produção e de custo (Chen & Lai, 2013).

Há evidências que a vacinação através da mucosa oral, intranasal, intra-rectal ou intra-vaginal são vias de administração mais eficazes que as vacinas sistémicas. Isto porque são esperadas respostas imunitárias locais rápidas necessárias para inibir e limitar o acesso de agente patogénico para o interior do hospedeiro através das superfícies da mucosa. Actualmente, as vacinas aprovadas para uso humano administradas por via mucosa são as vacinas contra a poliomielite, cólera, febre tifóide, rotavírus e a vacina contra a gripe (Yu & Vajdy, 2010). A administração de vacinas de DNA via oral

demonstrou protecção contra degradação e provocou respostas imunitárias (Greenland & Letvin, 2007).

Nas vacinas baseadas em VLPs, por exemplo no caso do vírus da influenza, foram demonstrados imunidade protectora quer por via intranasal quer por via intramuscular. A imunização intranasal é conhecida por induzir respostas imunes nas mucosas onde a maioria dos patogéneos são introduzidos no corpo. Na imunização intramuscular é tradicionalmente a via mais utilizada induz resposta imunitária sistémica ocorrendo ocasionalmente níveis mais baixos da imunidade na mucosa (Kang *et al.*, 2012).

No caso do HPV, a administração da vacina via nasal induziu títulos elevados de anticorpos na vagina. Na administração da vacina via vaginal, em tempos específicos durante o ciclo menstrual, são também induzidos elevados títulos de anticorpos no colo do útero. Logo, a combinação de ambas as vias de administração poderá ser um método utilizado para prevenir tanto a infecção inicial como a disseminação do vírus (Gersch *et al.*, 2012).

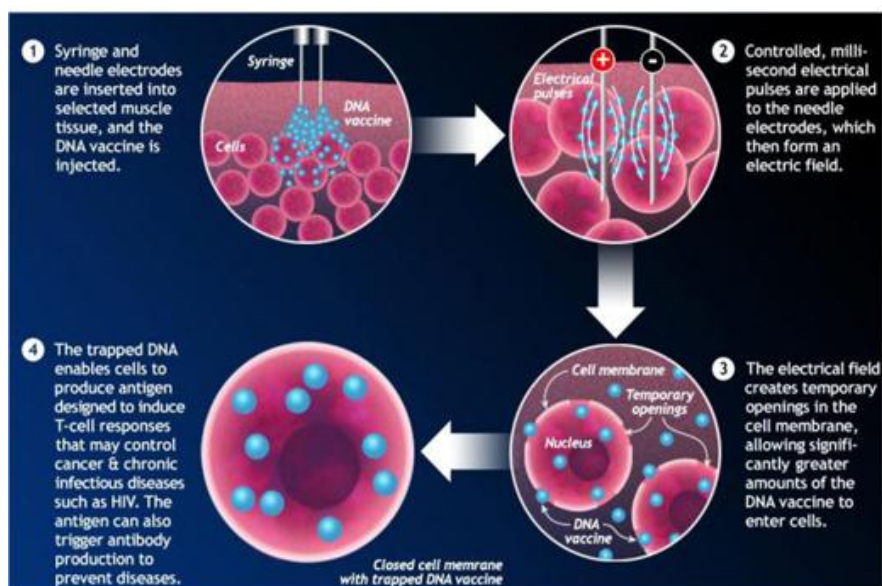
iii. Eletroporação (EP)

Avanços tecnológicos na área das vacinas de DNA têm sido notórios para o surgimento de vacinas mais viáveis. Para além das técnicas já mencionadas, a técnica de eletroporação amplia a entrega das vacinas aumentando desta forma a imunogenicidade (Sardesai & Weiner, 2011).

A eletroporação é utilizada para aumentar a eficiência de transfecção de vacinas de DNA *in vivo*. Envolve a aplicação de um pequeno campo eléctrico através do local de injeção para causar instabilidade na membrana temporariamente e, produzir um gradiente eléctrico para desta forma aumentar a absorção celular de macromoléculas entregues localmente (Figura 11) (Hutnick *et al.*, 2011).

Figura 11 - Representação do processo de eletroporação

(Adaptado de Sardesai & Weiner, 2011)

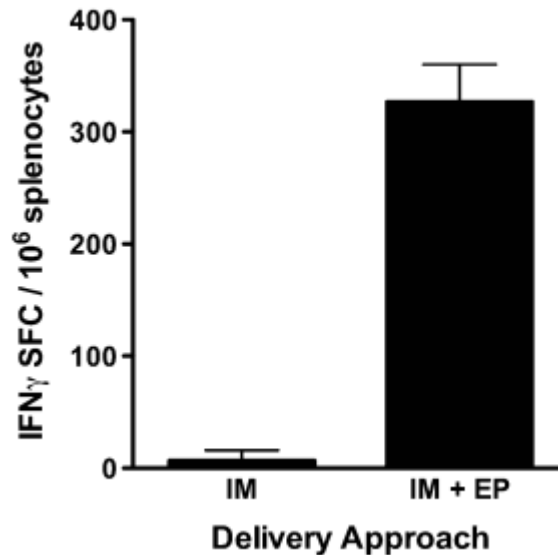


Quando um volume pequeno de DNA de plasmídeo é entregue por eletroporação as respostas imunogénicas são comparáveis quando há entrega de um grande volume de DNA de plasmídeo. É mais vantajoso entregar um pequeno volume com esta estratégia pois é possível aumentar a expressão do plasmídeo e induzir respostas inflamatórias devido a perturbação do tecido local contribuindo desta forma para o aumento da imunogenicidade (Greenland & Letvin, 2007).

As vantagens da técnica de aplicação da EP demonstra aumentar as respostas imunes humoral e celular, como também reduz o volume de injeção, minimiza o número de aplicações e prolonga o efeito terapêutico da vacina (Figura 12) (Bodles-Brakhop *et al.*, 2009).

Figura 12 – Representação do aumento da imunogenicidade que pode ser alcançado com a entrega da vacina de DNA através da injeção intramuscular com EP

(Adaptado de Ferraro *et al.*, 2011)



Esta técnica aumenta a captação do plasmídeo e também aumenta a distribuição do DNA através do tecido para além de provocar reacção inflamatória local, contribuindo desta forma para uma resposta imune mais forte (Flingai *et al.*, 2013).

Contudo, a aplicação de eletroporação requer um equilíbrio exacto de tensão e corrente, para desta forma evitar danos no tecido. Dependem de uma tensão constante, independentemente da resistência do tecido durante o impulso (Abdulhaqq & Weiner, 2008).

iv. Prime-Boost

O Prime-boost é um método para melhorar a qualidade e intensidade da resposta tanto a nível de vacinas DNA, como vectores virais ou proteínas recombinantes (Hutnick *et al.*, 2011).

Esta estratégia tem demonstrado ser capaz de induzir respostas imunitárias adequadas e eficazes contra agentes patogénicos intracelulares. Tem o intuito de combinar a imunidade celular com a humoral, provocada por cada sistema de entrega de forma individual, melhorando e modificando a resposta imune induzida contra o antigénio específico. Consiste na imunização de um indivíduo com duas ou mais doses. Uma vacina com a mesma formulação é chamada de prime-boost homóloga, enquanto envolvendo diferentes formulações é denominada de prime-boost heteróloga. Estudos demonstram que a imunização heteróloga é mais eficaz que imunização homóloga, especialmente contra patogéneos intracelulares (Nascimento & Leite, 2012).

O princípio do prime-boost heterólogo baseia-se no mesmo antigénio ser apresentado de forma diferente para o sistema imune durante a dose inicial e a de reforço. A formulação utilizada na dose inicial tem que ter a capacidade de induzir a resposta com o padrão requerido para conceder protecção ao indivíduo, já o reforço tem como função a manutenção e a expansão da resposta que inicialmente tinha sido estimulada. Posto isto, a estratégia do prime-boost envolve o uso de duas vacinas com formulações diferentes, cada uma codificando o mesmo antigénio mas administrado em intervalos de algumas semanas (Júnior *et al.*, 2004).

Assim sendo, a combinação de vacinas servirá para que a primeira induza a imunidade celular (memória) e a segunda para induzir a formação de anticorpos (Tabela 5) (Silva & Richtmann, 2006).

Tabela 5 - Estratégias de vacinação prime-boost heterólogos e propriedades das vacinas para contribuição da eficácia

(Adaptado de Nascimento & Leite, 2012)

Vector	Properties	Immune consequence	Most used vaccination		References
			Prime	Boost	
DNA vaccine	Encoded antigens delivered to MHC class I and class II processing pathways	CD4 ⁺ Th1 and CD8 ⁺ T cells	DNA	Viral	59,61,63,64,70
	Low level and constant expression of protein	Prolonged immune stimulation and induction of high-affinity T cells		BCG	59,63,64
	Presence of CpG motifs	Adjuvant for CMI		RP/Adj	59,63,64
	Expresses only vaccine antigen	Focused response on antigen			
Viral	Efficient delivery to MHC class I and class II process pathways	Expansion of T-cell responses induced by DNA vaccination	Viral	RP/Adj	59,60,63,64
	Higher levels of encoded antigen	Expansion of high-affinity T cells primed by DNA vaccine			
	Presence of CpG motifs and other TLR agonists	Adjuvant for CMI and strong production of pro-inflammatory cytokines			
	Non-productive replication in mammalian cells	Immune response largely focused on encoded antigen and safe for human use			
Bacterial (BCG)	Encoded antigens delivered to MHC class II processing pathways	Induction of CD4 ⁺ Th1/Th2 cells	Bacterial	Viral	59,63,64,70
Recombinant protein	Requires adjuvant and multiple immunizations	CD4 T cell and humoral responses	RP/Adj	RP/Adj	59,63,64
	Requires strong adjuvant	Poor induction of cellular responses, particularly of CD8 ⁺ T cells			

BCG = bacillus Calmette-Guérin; MHC = major histocompatibility complex; CpG = cytosine-phosphodiester bond-guanine; TLR = Toll-like receptor; Th1/Th2 = T helper cells 1 or 2; CMI = cell-mediated immunity; RP/Adj = recombinant protein/adjuvant.

Estas estratégias foram aplicadas para o desenvolvimento de vacinas contra doenças infecciosas tais como o HIV, tuberculose e malária, demonstrando resultados promissores. No caso do HIV usando a combinação de duas vacinas anteriores (que falharam no passado) reduziu cerca de 31% o risco de contrair o HIV, sendo que a protecção foi limitada a um ano, no entanto são resultados encorajadores para o desenvolvimento de novas vacinas para o HIV (Nascimento & Leite, 2012).

A estratégia de prime-boost heteróloga para a vacina contra a gripe implica que um indivíduo seja inicialmente imunizado com uma estirpe e depois um reforço com uma outra estirpe, para enriquecer a resposta humoral com anticorpos para os epítomos mais conservados do vírus da gripe (Kaur *et al.*, 2011).

Regra geral, as vacinas de DNA mostram melhores resultados quando combinadas com outras plataformas, tendo um efeito sinérgico na produção da resposta imune. Enquanto

as combinações das vacinas baseadas em vector com o reforço da mesma modalidade ou, vacinas baseadas em vector com o reforço das vacinas baseadas em proteínas, exigem menos imunizações para conseguir respostas adequadas (Koup & Douek, 2011).

Na seguinte tabela observa-se algumas combinações de vacinas possíveis de agrupar com estratégias prime-boost heterólogas.

Tabela 6 – Vacinas com Prime-Boost heterólogos comuns

(Adaptado de Lu, 2013)

Prime immunization	Boost immunization
DNA	Recombinant protein
	Inactivated Vaccine
	Viral vectors
	BCG
Viral vector	Recombinant Protein
BCG	Viral vector

A imunogenicidade desta estratégia heteróloga pode ainda ser melhorada através da inclusão de outros factores que possam facilitar ou intensificar o efeito da vacina, como por exemplo factores estimuladores, citocinas entre outros. Esta estratégia oferece oportunidades de obter respostas imunológicas únicas para permitir uma melhor protecção e imunogenicidade (Lu, 2013).

III. Conclusão

A vacinação é um dos maiores sucessos na história da saúde pública. São ferramentas rentáveis e eficazes para a prevenção de infecções virais, principalmente contra vírus que causam infecções agudas. Nas infecções virais agudas, quando se trata por exemplo de uma constipação, o vírus normalmente é eliminado do organismo no período de uma semana. Contudo, em alguns casos as infecções virais agudas tornam-se persistentes no hospedeiro, levando à sua intervenção. Nas infecções virais crônicas, o tipo de infecção é persistente, o que significa que os sintomas são de longa duração, tornando mais difícil e complexa a produção e obtenção das vacinas. Posto isto, a diversidade de doenças infecciosas apresentam um grande desafio para o desenvolvimento de novas estratégias vacinais.

Nos dias que correm são utilizadas muitas vacinas em todo mundo para prevenir doenças fatais. A indução do sistema imune através da vacinação pode ser um meio útil para evitar preocupações no que concerne à protecção da população em situações de risco.

A vacina ideal seria aquela que fosse altamente imunogénica provocando todos os tipos de resposta com apenas a entrega de uma dose baixa de antigénios, que oferecesse protecção, que fosse eficaz em indivíduos de diferentes faixas etárias e estados de saúde, que tivesse um método de administração adequada para se obter uma vacinação em massa, que fosse favorável e eficaz em termos de custos e tivesse uma vida durável de preferência à temperatura ambiente para evitar uma cadeia de frio.

Avanços significativos estão a ser feitos nesta área, focando essencialmente no que diz respeito à redução de custos para poder ser possível tornar as vacinas mais acessíveis às populações susceptíveis nos países em desenvolvimento. Desta forma o custo-benefício impede a mortalidade e reduz a morbidade por agentes infecciosos. Tais avanços têm resultado na descoberta de novos antigénios, adjuvantes, vectores ou sistemas de entrega. Da mesma forma, têm permitido introduzir novas estratégias de obtenção e produção de vacinas, assim como a introdução de novas maneiras de administração e apresentação de antigénios às células do sistema imunitário. Através desta inovação de estratégias vacinais têm surgido vacinas mais seguras, eficazes e polivalentes.

Conclui-se que o processo de produção à base de ovo é limitada e pouco rentável o que levou a que fossem implementadas novas estratégias tais como a produção em culturas de células ou através das VLPs.

No que concerne às vacinas até hoje desenvolvidas, algumas demonstraram um sucesso inigualável como foi o caso das vacinas recentes contra o HPV. No entanto, ainda apresentam algumas limitações que estão a ser analisadas com o objectivo de serem ultrapassadas na próxima geração de vacinas.

Outras tecnologias foram aqui descritas, como por exemplo as vacinas de DNA que são muito eficazes. Porém, foram formuladas tentativas para melhorar a entrega destas de forma a evitar, por exemplo o excesso de dose, recorrendo a adjuvantes ou o método de entrega das vacinas de DNA por eletroporação.

Como resultado final desta dissertação, podemos afirmar que os actuais estudos sobre novas técnicas para criação/produção de vacinas apresentam-nos um horizonte optimista e promissor para o futuro. No entanto, é importante reter que, sendo esta área de investigação um campo muito abrangente e com muitas áreas de estudo, novos desafios/doenças irão surgir nos próximos tempos o que poderá levar à necessidade de novas abordagens ao nível da criação e aplicação de vacinas.

IV. Bibliografia

- Abdulhaqq, S. & Weiner, D., (2008). DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. *Immunologic Research*, 42(1-3), pp.219–232.
- Alves, R., Gaspar, Â. & Ferreira, M., (2007). Reacções alérgicas a vacinas. *Revista Portuguesa Imunoalergologia*, 15(6), pp.465–483.
- Bernstein, D., (2010). Cell culture–derived influenza vaccines: has their time come? *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 51(9), pp.1005–1006.
- Berzofsky, J. *et al.*, (2004). Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(4), pp.450–462.
- Bodles-Brakhop, A., Heller, R. & Draghia-Akli, R., (2009). Electroporation for the delivery of DNA-based vaccines and immunotherapeutics: current clinical developments. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(4), pp.585–592.
- Campo, M. & Roden, R., (2010). Papillomavirus prophylactic vaccines: established successes, new approaches. *Journal of Virology*, 84(3), pp.1214–1220.
- Chen, Q. & Lai, H., (2013). Plant-derived virus-like particles as vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(1), pp.26–49.
- Chua, J. & Chen, W., (2010). Bench-to-bedside review: vaccine protection strategies during pandemic flu outbreaks. *Critical Care (London, England)*, 14(2), p.218.
- Derhovanessian, E. & Pawelec, G., (2012). Vaccination in the elderly. *Microbial Biotechnology*, 5(2), pp.226–232.
- Diniz, M. & Ferreira, L., (2010). Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. *Estudos Avançados*, 24, p.70.

- Ellebedy, A. & Webby, R., (2009). Influenza vaccines. *Vaccine*, 27 Suppl 4, pp.D65–D68.
- Fernandes, A., Maciel, L. & Donadi, E., (2003). HLA e as doenças auto-imunes endócrinas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 47, pp.601–611.
- Ferraro, B. *et al.*, (2011). Clinical applications of DNA vaccines: current progress. *Clinical Infectious Diseases*, 53(3), pp.296–302.
- Flingai, S. *et al.*, (2013). Synthetic DNA vaccines: improved vaccine potency by electroporation and co-delivered genetic adjuvants. *Frontiers in Immunology*, 4(November), p.354.
- García-Sastre, A. & Mena, I., (2013). Novel vaccine strategies against emerging viruses. *Current Opinion in Virology*, 3(2), pp.210–216.
- Geels, M. & Ye, K., (2010). Developments in high-yield system expressed vaccines and immunotherapy. *Recent Patents on Biotechnology*, 4(3), pp.189–197.
- Gersch, E., Gissmann, L. & Garcea, R., (2012). New approaches to prophylactic human papillomavirus vaccines for cervical cancer prevention. *Antiviral Therapy*, 17(3), pp.425–434.
- Gomez Lorenzo, M. & Fenton, M., (2013). Immunobiology of influenza vaccines. *Chest*, 143(2), pp.502–510.
- Greenland, J. & Letvin, N., (2007). Chemical adjuvants for plasmid DNA vaccines. *Vaccine*, 25(19), pp.3731–3741.
- Halliday, J., Klenerman, P. & Barnes, E., (2011). Vaccination for hepatitis C virus: closing in on an evasive target. *Expert Review of Vaccines*, 10(5), pp.659–672.
- Hefferon, K., (2014). Plant virus expression vector development: new perspectives. *BioMed Research International*, 2014, p.785382.

- Hillaire, M., Osterhaus, A. & Rimmelzwaan, G., (2011). Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes as a basis for the development of broadly protective influenza vaccines. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, p.939860.
- Homma, A. *et al.*, (2011). Atualização em vacinas , imunizações e inovação tecnológica Vaccines , immunization and technological innovation : an update. *Ciências da Saúde Coletiva*, 16, pp.445–458.
- Huber, S. *et al.*, (2014). T cell responses to viral infections - opportunities for peptide vaccination. *Frontiers in Immunology*, 5(April), p.171.
- Hutnick, N. *et al.*, (2011). Selected approaches for increasing HIV DNA vaccine immunogenicity in vivo. *Current Opinion in Virology*, 1(4), pp.233–240.
- Júnior, J. *et al.*, (2004). É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculose? *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 4, pp.468–477.
- Kang, S. *et al.*, (2009). Influenza vaccines based on virus-like particles. *Virus Research*, 143(2), pp.140–146.
- Kang, S., Kim, M. & Compans, R., (2012). Virus-like particles as universal influenza vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 11(8), pp.995–1007.
- Kang, S., Song, J. & Compans, R., (2011). Novel vaccines against influenza viruses. *Virus Research*, 162(1-2), pp.31–38.
- Kaur, K., Sullivan, M. & Wilson, P., (2011). Targeting B cell responses in universal influenza vaccine design. *Trends in Immunology*, 32(11), pp.524–531.
- Kim, Y., Park, J. & Prausnitz, M., (2012). Microneedles for drug and vaccine delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(14), pp.1547–1568.
- Koup, R. & Douek, D., (2011). Vaccine design for CD8 T lymphocyte responses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, pp.1–15.
- Lambert, L. & Fauci, A., (2010). Influenza vaccines for the future. *The New England Journal of Medicine*, 363(21), pp.2036–2044.

- Lee, Y. *et al.*, (2014). New vaccines against influenza virus. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 3, pp.12–28.
- Lin, K. *et al.*, (2011). Therapeutic HPV DNA vaccines. *Immunologic Research*, 47, pp.86–112.
- López-Macías, C., (2012). Virus-like particle (VLP)-based vaccines for pandemic influenza. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, (March), pp.411–414.
- Lu, S., (2013). Heterologous Prime-Boost Vaccination. *Current Opinion in Immunology*, 21(3), pp.346–351.
- Ma, B. *et al.*, (2012). Emerging human papillomavirus vaccines. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 17(4), pp.469–492.
- McElhaney, J., (2011). Influenza vaccine responses in older adults. *Ageing Research Reviews*, 10(3), pp.379–388.
- Mota-Sánchez, J. (2009). Vacunas de ADN : inducción de la respuesta inmunitaria. *Salud Pública de México*, 51(1), 463–469.
- Nascimento, I. & Leite, L., (2012). Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(12), pp.1102–1111.
- Pandey, A. *et al.*, (2010). Egg-independent vaccine strategies for highly pathogenic H5N1 influenza viruses. *Human Vaccines*, 6(2), pp.178–188.
- Petrovsky, N. & Aguilar, J., (2004). Vaccine adjuvants : Current state and future trends. *Immunology and Cell Biology*, 82, pp.488–496.
- Saade, F. & Petrovsky, N., (2012). Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 11(2), pp.189–209.
- Sadanand, S., (2011). Vaccination : the present and the future. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 84, pp.353–359.

- Sardesai, N. & Weiner, D., (2011). Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success. *Current Opinion in Immunology*, 23(3), pp.421–429.
- Schatzmayr, H., (2003). Novas perspectivas. *História, Ciência, Saúde - Manguinhos*, 10(suplemento 2), pp.655–669.
- Silva, L. & Richtmann, R., (2006). Vaccines under development: group B streptococcus, herpes-zoster, HIV, malaria and dengue. *Jornal de Pediatria*, 82(3 Suppl), pp.S115–S124.
- Singh, N., Pandey, A. & Mittal, S., (2010). Avian influenza pandemic preparedness: developing pre-pandemic and pandemic vaccines against a moving target. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 12, p.e14.
- Staats, H. & Thompson, A., (2011). Cytokines: The future of intranasal vaccine adjuvants. *Clinical and Developmental Immunology*, p.289597.
- Suh, H., Shin, J. & Kim, Y., (2014). Microneedle patches for vaccine delivery. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 3, pp.42–49.
- Tang, D. *et al.*, (2009). Adenovirus as a carrier for the development of influenza virus-free avian influenza vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 8(4), pp.469–481.
- Walker, L. & Burton, D., (2010). Rational antibody-based HIV-1 vaccine design: current approaches and future directions. *Current Opinion in Immunology*, 22(3), pp.358–366.
- Wang, J. & Roden, R., (2013). Virus-like particles for the prevention of human papillomavirus-associated malignancies. *Expert Review of Vaccines*, 12(2), pp.129–141.
- Yu, M. & Vajdy, M., (2010). Mucosal HIV transmission and vaccination strategies through oral compared with vaginal and rectal routes. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 10(8), pp.1181–1195.