

CONTRIBUIÇÕES DA BIOTECNOLOGIA NO DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO DE VACINAS DE PRIMEIRA, SEGUNDA E TERCEIRA GERAÇÕES

Luana Camilla Cordeiro Braz¹, Darlyson Tavares Guimarães², Michelle Rossana Ferreira Vaz³, Franklin Ferreira de Farias Nóbrega^{3}*

¹ Bolsista PIBIC/CNPq/UFCG, Discente do curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

² Iniciação científica PIVIC/UFCG, Discente do curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

³ Professor Doutor. Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Universidade Federal de Campina Grande.

*Correspondência: Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande (CDSA-UFCG), Rua Luiz Grande, CEP 58540-000, Sumé, Paraíba. *E-mail:* franklin.ferreira@ufcg.edu.br.

RESUMO

Desde as descobertas inovadoras de Jenner e Pasteur, o desenvolvimento de técnicas de imunização foi alvo de inúmeros avanços tecnológicos. Esses avanços propiciaram benefícios importantes no campo da saúde pública, com a erradicação de doenças, prevenção de epidemias e redução no número de mortes por doenças infecciosas. Após o advento da Biotecnologia foram ampliadas as fronteiras da vacinologia, com suporte tecnológico para o desenvolvimento de vacinas cada vez mais seguras e eficientes. Houve um impacto significativo no modo como são desenvolvidas as vacinas consideradas de primeira e segunda gerações, e também foi possibilitado o desenvolvimento de uma terceira geração de vacinas, as vacinas de DNA. Essa última geração ampliou a visão sobre as vacinas, antes empregadas apenas de forma preventiva, e possibilitou o desenvolvimento de vacinas terapêuticas aplicadas inclusive a doenças não-infecciosas, como o câncer. Há atualmente uma busca no mundo inteiro por novas vacinas para os principais problemas de saúde pública e no Brasil tem se desenvolvido programas visando à autossuficiência no setor, de modo a reduzir gastos públicos com vacinas importadas e focar especificamente em problemas epidemiológicos nacionais.

Descritores: Técnicas de imunização, Vacinologia, Vacinas recombinantes, Vacinas de DNA.

THE BIOTECHNOLOGY CONTRIBUTIONS IN DEVELOPMENT AND PRODUCTION OF FIRST, SECOND AND THIRD GENERATIONS VACCINES

ABSTRACT

Since the groundbreaking discoveries of Jenner and Pasteur, the development of immunization techniques has undergone numerous technological advances. These advances have provided important benefits in the field of public health, with the eradication of diseases, prevention of epidemics and significant reduction in deaths from infectious diseases. After the advent of biotechnology were enlarged the borders of vaccinology, with technological support to the development of increasingly safe and effective vaccines. There was a significant impact on how the first and second generation vaccines are developed and has also enabled the development of a third generation, the DNA vaccines. This latest generation has expanded the vision of the vaccines, just before employed preventively, and enabled the development of therapeutic vaccines applied also in the treatment of non-infectious diseases, such as cancer. There is currently a worldwide search for new vaccines for the major public health problems. And Brazil has developed programs aimed at self-sufficiency in the sector, in order to reduce public spending on imported vaccines and focus specifically on national epidemiological problems.

Keywords: Immunization techniques, Vaccinology, Recombinant vaccines, DNA vaccines.

INTRODUÇÃO

As vacinas originalmente eram empregadas na profilaxia das infecções e seu desenvolvimento foi baseado no princípio de que a existência de um contato prévio com o antígeno origina uma resposta imune mais rápida e eficiente nos contatos subsequentes.

O desenvolvimento pioneiro da vacina contra a varíola feito pelo médico inglês, Edward Jenner no século XVIII e a introdução do conceito de “vacinação” por Louis Pasteur no século XIX marcaram o início de uma nova era para a medicina (1,2,3). Essa nova era da vacinologia trouxe inúmeros benefícios para a sociedade com o estabelecimento de estratégias de imunização em massa. Isso possibilitou a prevenção de epidemias e já foi responsável pela erradicação de várias doenças como a varíola, em todo o mundo (1), a febre amarela e a poliomielite, no Brasil.

Desde então, no campo da vacinologia tem sido realizadas um número cada vez maior de pesquisas que culminam no desenvolvimento de vacinas cada vez mais eficientes para prevenção (ou mais recentemente para o tratamento) de diversas doenças. Várias estratégias têm sido utilizadas para o desenvolvimento de diferentes tipos de vacinas.

As vacinas de primeira geração são produzidas com micro-organismos vivos atenuados, como a vacina BCG contra a tuberculose, ou mortos inativados, como a vacina contra a *Bordetella pertussis* (4). Ainda hoje, as melhores vacinas ainda são as produzidas com organismos vivos atenuados, como no caso da febre amarela, varíola e influenza (1).

Outra estratégia de vacinação, considerada de segunda geração, emprega antígenos purificados que podem ser provenientes de fontes naturais, sintéticas ou mesmo derivados da tecnologia do DNA recombinante (3). As toxinas empregadas podem ser inativadas, como no caso das vacinas antitetânica e antidiftérica. Outras vacinas empregam componentes de superfície purificados, como os polissacarídeos do *Hemophilus influenzae* tipo B e do meningococo (1).

Mais recentemente, surgiram as vacinas gênicas ou de terceira geração, onde o cDNA (DNA complementar) que codifica antígenos potencialmente imunizantes é carregado por plasmídeos de DNA (1,3). Entre as vantagens dessas vacinas está a maior facilidade no controle de qualidade, a estabilidade à temperatura ambiente e a

possibilidade de serem liofilizadas (5). Esses aspectos facilitam a utilização das mesmas em campanhas de vacinação.

Na última década, os avanços na tecnologia de desenvolvimento de vacinas permitiram a introdução de novas estratégias para a obtenção e produção de antígenos, assim como foram otimizadas novas maneiras de se administrar e apresentar esses antígenos para as células do sistema imune. Estas estratégias abriram caminho para inovações, particularmente no contexto do desenvolvimento de vacinas mais seguras, eficazes e polivalentes (3).

O advento da biotecnologia moderna, em particular a disseminação das técnicas de manipulação genética, alterou de diferentes maneiras a pesquisa e o desenvolvimento de vacinas, sejam elas de primeira, segunda ou terceira geração. Houve vários avanços na descoberta de novos antígenos, adjuvantes, vetores ou sistemas de entrega (6).

Tabela 1. Principais contribuições da biotecnologia no desenvolvimento de vacinas (6)

Tipo vacinal	Estratégia biotecnológica	Vacinas
Vacinas de subunidades	Produção de proteínas recombinantes em sistemas heterólogos	Hepatite B, <i>pertússis</i> acelular, HPV
Patógenos atenuados bivalentes	Manipulação genética para inserção de genes que codifiquem antígenos	Dengue, *BCG, * <i>Salmonella Typhi</i> , *Adenovírus
Vacinas de DNA	Imunização com plasmídeos recombinantes	Vacina contra melanoma

*Vacinas ainda não disponíveis para uso em humanos; *vacina para uso em cães

Apesar de boa parte das vacinas administradas atualmente ainda serem fruto de metodologias desenvolvidas em meados do século XX, espera-se que nos próximos anos sejam utilizados um número cada vez maior de novas vacinas mais seguras e eficazes geradas a partir de técnicas de manipulação genética e produção de proteínas recombinantes em sistemas heterólogos (6).

Nessa revisão serão apresentadas as três gerações de vacinas, citando estratégias de desenvolvimento com enfoque nas contribuições da Biotecnologia Moderna no setor. Também será apresentado um panorama atual da vacinologia:

desafios a superar, novas tecnologias, pesquisas em andamento e principais vacinas aprovadas e em utilização nas estratégias de imunização em massa.

VACINAS DE PRIMEIRA GERAÇÃO

Diversas estratégias têm sido utilizadas para o desenvolvimento de diferentes tipos de vacinas. As vacinas de primeira geração, que se reportam principalmente ao começo do século XX, foram produzidas com micro-organismos vivos e atenuados, como a vacina BCG contra a tuberculose, ou mortos e inativados, como a vacina contra a *Bordetella pertussis* (3,7).

Uma das técnicas de produção de vacinas de primeira geração é a inativação do micro-organismo. Os agentes infecciosos podem ser inativados pelo calor, por agentes químicos (formaldeído, fenol), ou pela radiação. Assim tornam-se incapazes de se multiplicar, mas apresentam sua estrutura e seus componentes, preservando a capacidade de estimular o sistema imunológico. As vacinas antipertussis, a contra febre tifóide (parenteral) e a contra peste bubônica são produzidas dessa maneira (1,8).

Algumas dessas vacinas são de alta eficácia, como a vacina Salk (antipólio injetável) e a anti-hepatite A. Outras são parcialmente efetivas e necessitam de melhorias para aumentar o percentual de proteção e/ou duração da imunidade, como no caso das vacinas contra influenza e febre tifóide. Outros exemplos são a vacina viral contra raiva e as vacinas bacterianas contra coqueluche, antraz e cólera. Muitas dessas devem ser substituídas por vacinas em vetores ou vacinas com subunidades (1,8).

Além da inativação também podem ser utilizados micro-organismos atenuados como nos casos das vacinas contra a febre amarela, a varíola e a influenza. Essas vacinas são consideradas as melhores vacinas por simularem o curso natural da infecção.

A atenuação é um processo pelo qual a virulência (patogenicidade) do agente infeccioso é reduzida de forma segura, para não causar a doença, mas ao mesmo tempo, é capaz de estimular a resposta imunológica. O agente patogênico é enfraquecido por meio de passagens por um hospedeiro não natural, ou por um meio que lhe seja desfavorável. Portanto, quando inoculado num indivíduo, multiplica-se sem causar doença, mas estimulando o sistema imunológico. Contudo, existe um pequeno risco de que o agente atenuado possa reverter para formas infecciosas perigosas (8).

Outro tipo de vacina, baseado nos métodos de Pasteur, consiste na atenuação do agente infeccioso por passagens sucessivas em meios de cultura. Os meios de cultivo *in vitro* não reproduzem as condições naturais e muitos genes mantidos sob pressão

seletiva *in vivo* deixam de ser expressos, o que pode com o passar do tempo reduzir a patogenicidade da maioria dos micro-organismos cultivados (1).

A vacina contra tuberculose (BCG) é produzida pela passagem em cultura de bacilo Calmette-Guérin (*Mycobacterium bovis*), o que foi feito mais de duzentas vezes durante o período de treze anos (1908-1921) (1).

Nessa categoria, também deve ser destacada a estratégia em que micro-organismos não patogênicos derivados de outros hospedeiros são utilizados como antígenos para vacinas voltadas para o controle de doenças causadas por patógenos assemelhados (6).

Essas práticas não são isentas de riscos e por isso muitas vacinas novas têm sido produzidas usando a tecnologia do DNA recombinante (1). Patógenos atenuados empregados nas vacinas de primeira geração podem reverter ao estado nativo virulento. Como, em muitos casos, não se conhece a natureza da alteração genética sofrida pelo micro-organismo durante a atenuação, a possibilidade de reversão à virulência, embora pouco provável, é uma realidade (6). Além dos riscos da reversão de cepas avirulentas para virulentas, as vacinas virais atenuadas causam infecções graves em crianças portadoras de imunodeficiências primárias (1).

As técnicas atualmente disponíveis para manipulação genética permitem obter, com relativa facilidade, mutantes atenuados por meio de estratégias de clonagem gênica e mutagênese. Podem ser gerados micro-organismos atenuados (vírus e bactérias) de forma precisa e com mais segurança. Nesses mutantes os genes envolvidos com a patogenicidade ou metabolismo primário são inativados de forma a não comprometerem a viabilidade do organismo, mas torná-los incapazes de causar doença (6).

No entanto, os custos elevados envolvidos nos testes clínicos e o uso consagrado de determinadas formulações, como os vírus da poliomielite, sarampo, febre amarela, a bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, entre outros, diminuem o interesse de indústrias e laboratórios em investir nessas novas formulações vacinais (6).

Muitas estratégias de vacinação que utilizam parasitas vivos, atenuados ou antígenos definidos têm sido empregadas contra a leishmaniose cutânea. A “leishmanização” é descrita como a estratégia de imunização mais bem sucedida em humanos e desenvolve imunidade duradoura após infecção induzida com parasitas viáveis não atenuados. Uma vez que vacinas com parasitos vivos mimetizam o curso natural da infecção e induzem imunidade após a cura, sua utilização é promissora, porém não segura (9).

VACINAS DE SEGUNDA GERAÇÃO

A segunda geração surgiu com a noção de que, em alguns patógenos, a proteção vacinal pode ser obtida após a indução de anticorpos voltados para um único alvo, como uma toxina, responsável pelos sintomas da doença, ou açúcares de superfície que permitem ao sistema imune do hospedeiro neutralizar e eliminar bactérias que de outra forma se propagariam rapidamente antes de serem notadas por nossas principais linhas de defesa imunológica. Nesse grupo, destacam-se vacinas acelulares que empregam toxóides (toxinas purificadas e inativadas por tratamento químico), proteínas e polissacarídeos purificados, como as antitetânica, antidiftérica, hepatite B e as vacinas voltadas para o controle da meningite meningocócica e da pneumonia (6). As toxinas inativadas, chamadas de toxóides, ainda retêm atividade imunogênica suficiente para induzir a produção de anticorpos que se unem e neutralizam a toxina nativa (10).

Os investimentos em Biotecnologia nos últimos anos permitiram o desenvolvimento de uma segunda geração de vacinas molecularmente bem definidas, com o uso de peptídeos sintéticos, proteínas recombinantes, ou subunidades altamente purificadas (11). Estas vacinas de segunda geração, ou de subunidades, são potencialmente mais seguras do que aquelas produzidas a partir de micro-organismos vivos atenuados (12).

Em uma fase inicial, essas vacinas se restringiam à utilização de toxinas inativadas, como na vacina para tétano e difteria, e em um segundo momento, polissacarídeos purificados. A utilização de proteínas purificadas a partir de vírus ou bactérias se limitava a situações em que era possível cultivar e purificar antígenos específicos, como algumas toxinas, ou obtê-los a partir do soro de pacientes infectados, como no caso do vírus da hepatite B (6).

Uma das contribuições da Biotecnologia nessa geração é a possibilidade de produção de peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes. A identificação dos determinantes antigênicos em micro-organismos importantes na indução da proteção e o isolamento destes pela tecnologia do DNA recombinante têm propiciado que peptídeos sintéticos sejam produzidos em grande quantidade e usados como vacina (1).

Para que um peptídeo sintético seja produzido, o seu gene precisa ser clonado e inserido em sistemas de expressão heteróloga, que podem ser células bacterianas, leveduras, células de mamíferos e de insetos, para que estas secretem grandes quantidades desses antígenos. As células de insetos e de mamíferos tem a vantagem de produzir proteínas glicosiladas, o que não ocorre em células bacterianas (1,6). A

Figura 1 esquematiza o processo de produção de vacinas constituídas de proteínas e peptídeos recombinantes.

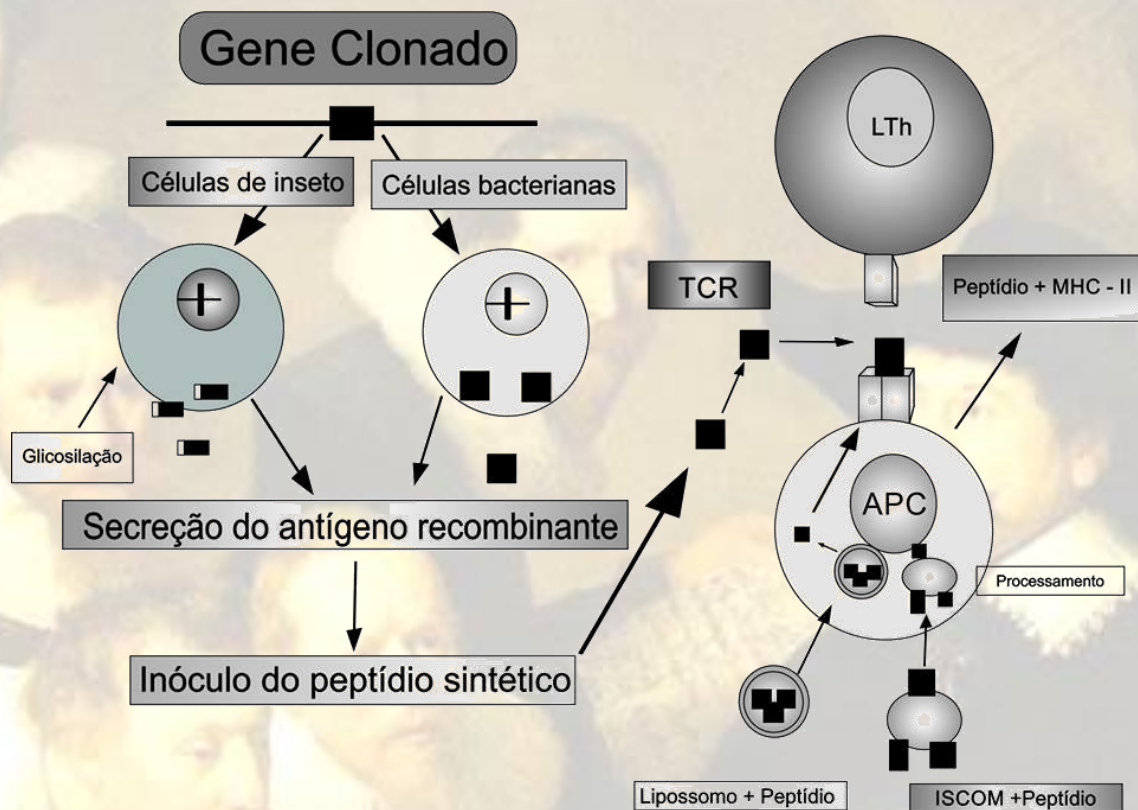


Figura 1: Processo de produção de vacinas constituídas de proteínas e peptídeos recombinantes e mecanismos de imunização (1). Na figura: APC (Célula apresentadora de antígenos); LTh (Linfócito T auxiliar); ISCOM (Complexo imunoestimulador) e TCR (Receptor de células T).

De fato, a fronteira da vacinologia que hoje recebe mais investimentos e desperta interesses tanto pela segurança de uso como no retorno financeiro está calcada na geração de vacinas de subunidades que utilizam antígenos recombinantes: a vacina voltada para o controle da hepatite B e, mais recentemente, a vacina preventiva para infecções com vírus do papiloma humano (HPV) (6).

A vacina contra o vírus da hepatite B é o melhor exemplo do resultado dos rápidos avanços que se têm verificado nos últimos anos na área da biologia molecular. Esta vacina foi licenciada pela primeira vez em 1981, sendo nesta altura um produto derivado do plasma de portadores crônicos da hepatite B. Só mais tarde, em 1986, o mesmo antígeno, uma proteína de superfície do vírus da hepatite B, começou a ser produzido em sistemas de cultura celular. Essa foi a primeira vacina recombinante aprovada e a sua concepção tem servido de modelo ao desenvolvimento de novas vacinas, principalmente em doenças provocadas por vírus (13).

Entretanto, tem sido constatado pela comunidade científica que estas vacinas recombinantes são em geral antígenos fracos, sendo pouco imunogênicas em função da perda do efeito adjuvante fornecido pelos demais componentes microbianos (13,14), para que os antígenos recombinantes sejam reconhecidos pelos linfócitos T, precisam ser apresentados por células apresentadoras de antígenos (APC) via moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), quando provenientes do meio externo. Na apresentação do antígeno pode não haver número suficiente de moléculas acopladas diretamente a moléculas do MHC (1).

Por isso, muitas dessas vacinas necessitam de ser administradas conjuntamente com substâncias que ampliem o seu efeito, os adjuvantes. Desta maneira, paralelamente ao crescente desenvolvimento da tecnologia para o desenvolvimento e produção de novas vacinas, também há um número crescente de pesquisas para a descoberta de adjuvantes mais seguros e potentes que tornem essas vacinas mais eficazes e estáveis (13).

Os adjuvantes podem ser definidos como quaisquer substâncias que, incorporadas a uma formulação de vacina, atuam para acelerar, prolongar ou ainda aumentar a qualidade e a especificidade da resposta imunológica a um determinado antígeno (14). Os adjuvantes aumentam a resposta inflamatória por estimular o sistema imune, sendo que alguns formam com o antígeno um complexo insolúvel que retarda a sua degradação (1). As vantagens potenciais de seu uso incluem o aumento da imunogenicidade de antígenos fracos, a redução da quantidade de antígeno e do número de imunizações necessárias para se conferir a proteção adequada (14).

Há várias vias possíveis de ação, de acordo com a formulação utilizada: (a) formação de depósitos no local de injeção, garantindo a formação de anticorpos pela liberação lenta do antígeno (15); (b) estímulo de células T, indução de citocinas, e o consequente direcionamento dos antígenos às células dendríticas foliculares, como no caso do muramil-dipeptídeo (MDP) e de lipopolissacarídeos de membrana (LPS) (14); (c) estímulo seletivo de citocinas, aumentando a formação de isotipos específicos de anticorpos (16); (d) estímulo de linfócitos T citotóxicos, conseguida por adjuvantes como ISCOMs (complexos imunoestimulantes) e lipossomos (membranas lipídicas ocas) (17) e (e) uso de vacinas recombinantes vivas (18).

Muitas doenças causadas por microorganismos dependem de toxinas secretadas, entre as quais a difteria e o tétano. Vacinas contra estas doenças foram obtidas com a purificação e a inativação destas toxinas. A vacina tríplice bacteriana (DTP) inclui os toxóides do tétano e da difteria e a vacina contra a coqueluche que poderá conter uma

preparação inativada da bactéria *Bordetella pertussis* ou apenas subunidades, sendo então denominada acelular, de melhor qualidade, porém de maior custo (10).

Dentro de poucos anos, os brasileiros terão à sua disposição uma vacina de segunda geração contra a coqueluche, desenvolvida pelo Instituto Butantan. O produto, tão eficaz quanto o utilizado atualmente, apresenta a vantagem de causar menos efeitos colaterais em comparação com seu futuro antecessor, principalmente febres (19).

As mudanças no desenvolvimento das novas vacinas refletem avanços na descoberta de novos antígenos, adjuvantes, vetores ou sistemas de entrega. Embora boa parte das vacinas atualmente administradas em crianças e adultos ainda seja fruto de metodologias desenvolvidas em meados do século XX, espera-se que os próximos anos tragam um número cada vez maior de novas vacinas mais seguras e eficazes geradas a partir de técnicas de manipulação genética e produção de proteínas recombinantes em sistemas heterólogos (6).

VACINAS DE TERCEIRA GERAÇÃO

A terceira geração de vacinas parte de um conceito inovador que a diferencia de uma forma radical das outras gerações vacinais (6). Nessa, ao invés da utilização de uma proteína ou um vírus completo inativado, como se faz nas vacinas de primeira e segunda gerações, o paciente recebe a informação genética que codifica uma proteína típica do agente agressor, passando a expressar permanentemente a proteína exógena, estimulando seu próprio sistema imune (20).

Essas vacinas, também denominadas vacinas gênicas ou vacinas de DNA, consistem na introdução de genes ou seus fragmentos, que codificam antígenos potencialmente imunogênicos, em vetores virais ou em DNA plasmidial (21). Essas vacinas podem ter finalidade preventiva, de forma semelhante às vacinas clássicas, ou curativa, levando o sistema imune a atacar os agentes agressores já instalados no organismo (20).

O conceito de imunização a partir de fragmentos de DNA surgiu em 1990, quando a partir da inserção de DNA plasmidial contendo genes da luciferase, β -galactosidase em músculo esquelético de ratos foi observada uma expressão de longo prazo e em pequenas quantidades dessas proteínas (22). Até então, acreditava-se que o DNA livre seria rapidamente degradado e não seria aplicável para imunização (23).

A comprovação do método ocorreu em 1993 pela demonstração da eficácia de uma vacina de DNA contra Influenza A em ratos (24). Nesse estudo foi realizada a inserção de uma construção plasmidial codificando uma nucleoproteína de H1N1 por

via intramuscular. Os animais imunizados foram expostos a doses letais de H3N2 e 90% deles sobreviveram. Um aspecto importante observado foi a indução de ambas as respostas humoral e celular, pela detecção de linfócitos T citotóxicos e anticorpos específicos para o antígeno (23).

A partir de então, as vacinas de DNA tornaram o campo de pesquisa que mais rapidamente cresce na tecnologia de vacinas. A Figura 2 mostra um gráfico de evolução no número de publicações envolvendo vacinas de DNA. No entanto, em muitos casos a vacinação por DNA ainda é dificultada pela baixa eficácia. Assim, tem sido desenvolvidas uma variedade de estratégias para melhorar as respostas imunes induzidas por vacinas gênicas (25).

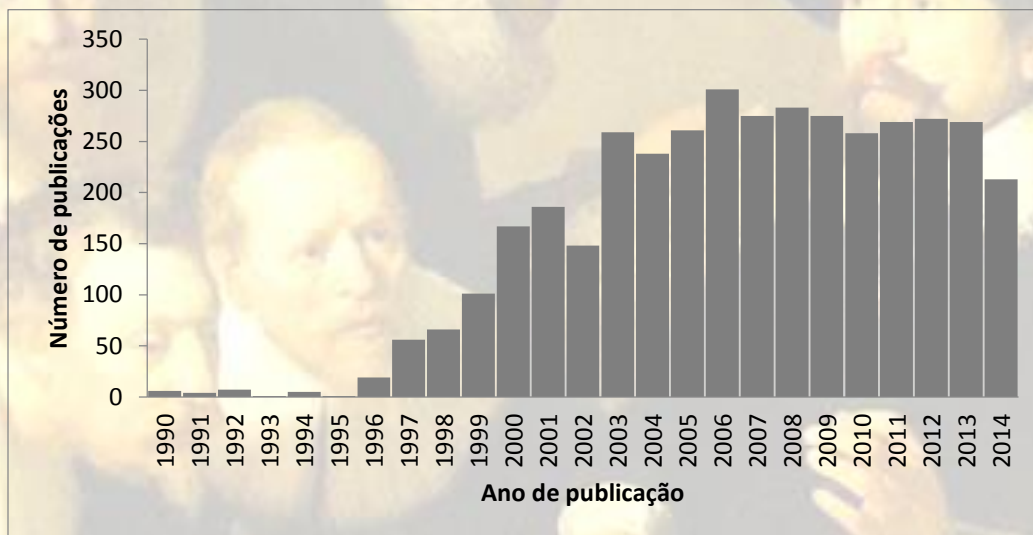


Figura 2: Evolução no número de publicações envolvendo vacinas de DNA (38). Dados da busca realizada na PubMed pelos termos “DNA vaccine” ou “Third generation vaccines” encontrados no título ou resumo dos trabalhos publicados desde o ano de 1990.

As vacinas de DNA tornaram-se um instrumento valioso para o desenvolvimento de vacinas com características terapêuticas. Sem dúvida, mais do que uma vacina específica, as vacinas DNA representam uma forma alternativa de desenvolver imunoterapias viabilizadas graças à introdução das técnicas de DNA recombinante à pesquisa vacinal (6).

Construção de vacinas de DNA e vias de administração

As etapas para construção de vacinas de DNA envolvem a identificação e isolamento do fragmento de DNA (gene) que codifica o antígeno imunogênico. Esse DNA é então inserido em um plasmídeo que permitirá a expressão e replicação do gene em células eucarióticas ou procarióticas (Figura 3).

Os plasmídeos utilizados em vacinas gênicas devem conter os seguintes elementos essenciais: (a) um promotor de expressão para células de mamíferos; (b) sinal de poliadenilação (poliA) do transcrito (mRNA), (c) um marcador de seleção; (d) uma origem de replicação procariótica e (e) sítio de múltipla clonagem onde é inserido o gene de interesse (7).

Após a clonagem do gene no plasmídeo, eles são introduzidos em bactérias hospedeiras, geralmente *Escherichia coli*, com o objetivo de produzir plasmídeos em larga escala e ter quantidade suficiente de DNA para vacinação (3,6).

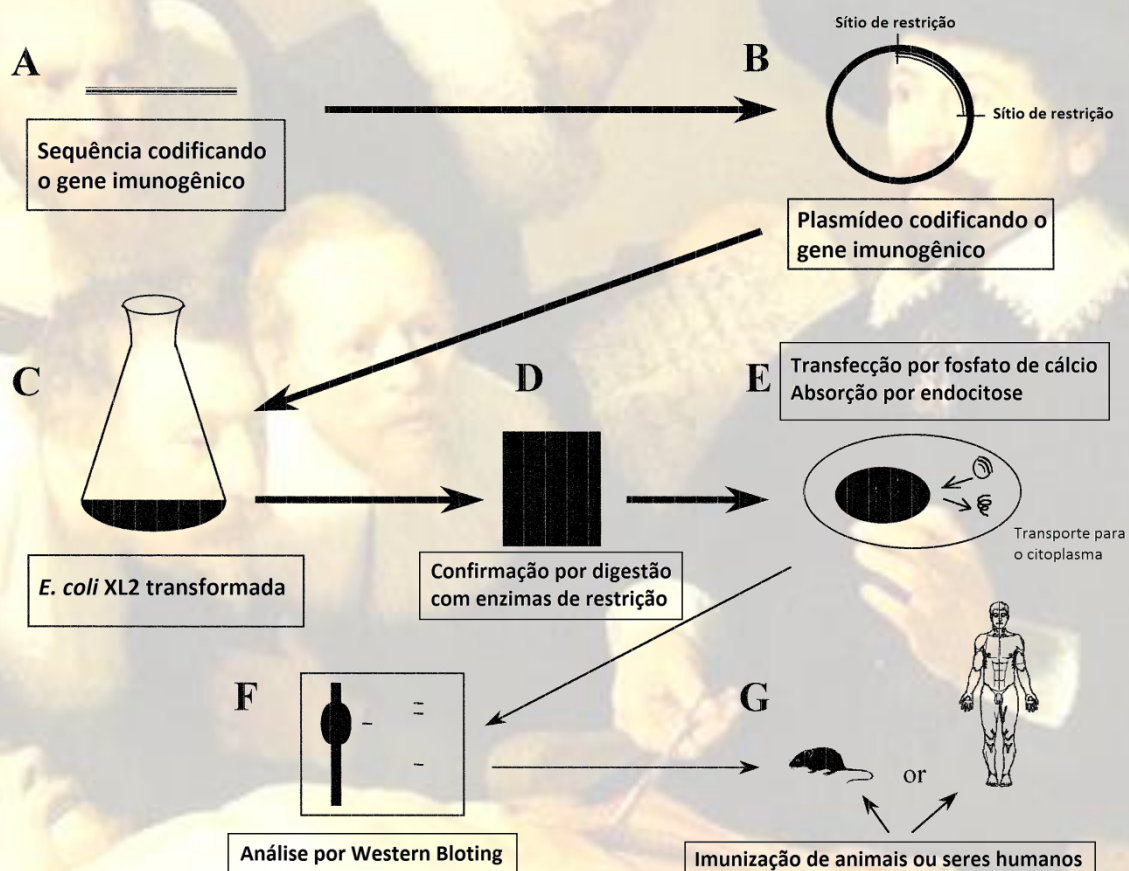


Figura 3: Etapas para a construção de vacinas de DNA. Adaptado de (23).

Esse procedimento de produção é relativamente simples e menos oneroso do que aquele envolvido na obtenção de proteínas recombinantes como no caso das vacinas de segunda geração. Assim, a imunogenicidade e eficácia dessas vacinas tem sido analisadas em um grande número de sistemas e os resultados de estudos pré-clínicos tem dado suporte aos estudos clínicos em humanos para uma variedade de doenças como o câncer (25).

Em seguida é feita a inoculação de células ou tecidos com vacina de DNA. O principal método de administração utilizado é por meio de injeção intramuscular ou cutânea. Essa é uma técnica de baixo custo e é historicamente o principal método de administração de vacinas (23). Também tem sido locais de administração o baço e uma variedade de mucosas como nariz ou intestino (25).

Outra maneira é por meio de bombardeamento de partículas ou “*gene gun*” em que o DNA pode ser introduzido principalmente na pele. Esse método utiliza uma onda de choque gerada por hélio comprimido para acelerar partículas de ouro revestidas de DNA diretamente nas células de tecidos alvo (23).

Em estudo de uma vacina para o vírus da gripe (26), utilizando o método da injeção foram necessários 100 mg de DNA purificado já no método do “*gene gun*” apenas 0,4 mg foram capazes de proteger os animais. Os benefícios do método é necessidade de quantidades muito menores de DNA sem requerer o uso de vetores de agentes infecciosos ou adjuvantes (23).

Um aspecto importante é que a alteração das doses de pequenos roedores para animais maiores e seres humanos não é um obstáculo considerando que uma dada dose de DNA pode efetivamente induzir resposta imune independente do tamanho do organismo (25).

Mecanismos de indução da imunidade

Embora o mecanismo de indução da imunidade por vacinas de DNA ainda permaneça incerto, o aumento lento da resposta imune após a vacinação com DNA sugere que este siga um caminho complexo que pode mimetizar a infecção viral natural (27).

No mecanismo mais aceito atualmente, após a inoculação intramuscular, o DNA é incorporado às células musculares (miócitos) e/ou células apresentadoras de antígeno (APC). O DNA plasmidiano é internalizado pela célula e a transcrição do imunogene é iniciada utilizando o maquinário celular do hospedeiro. Em seguida, o RNA mensageiro é traduzido para que ocorra a síntese do antígeno proteico relacionado ao agente infeccioso. Alguns dos antígenos produzidos pelas células musculares são secretados para o espaço extracelular, onde podem tanto estimular linfócitos B a produzir anticorpos específicos como ser endocitados por outras células apresentadoras de antígenos (7,27).

Diferentemente das vacinas inativadas ou de subunidade, as vacinas de DNA resultam em uma exibição antigênica via moléculas de moléculas de classe I e II que

são codificadas por genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC I e MHC II), ativando linfócitos T CD4+, TCD8+ (7,27).

As vacinas de DNA são, portanto, capazes de induzir ambos os tipos de imunidade protetora, humoral e celular, com a estimulação de linfócitos T CD4+ e T CD8+, sem alguns dos possíveis riscos associados às vacinas com organismos vivos (28).

Pesquisas, ensaios clínicos, vacinas aprovadas e perspectivas

Existem atualmente inúmeras pesquisas nacionais e internacionais visando o desenvolvimento de vacinas de DNA. Na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, o Centro de Pesquisas em Tuberculose (CPT) vem desenvolvendo uma vacina de DNA que tem capacidade não só preventiva contra o estabelecimento da tuberculose (TB) experimental como também atividade terapêutica contra a doença já estabelecida. Os experimentais demonstraram que a vacina de DNA pode curar casos crônicos assim como a doença disseminada e a tuberculose multi-droga resistente. Ela impede também a reativação da doença em animais imunodeprimidos (29).

Pesquisas também têm sido feitas visando ao tratamento e/ou prevenção da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida). Em uma pesquisa da Escola de Medicina de Stanford (EUA) foi possível modificar geneticamente os linfócitos T de modo a torná-los resistentes à entrada do vírus. Outros grupos procuram desenvolver uma vacina contra o vírus. Uma pesquisa feita pelo Instituto de Tecnologia de Pasadena mostrou que uma solução contendo genes responsáveis pela produção de anticorpos contra o HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) impediu, em modelo animal, a contaminação pelo vírus (30).

Atualmente, estão listados 25 estudos clínicos em andamento para avaliar vacinas de DNA no banco de dados americano Clinical Trials (Figura 4), nenhum deles é desenvolvido no Brasil. A maioria (68%) destes ensaios está investigando vacinas contra câncer (48%) ou o HIV (20%). Quase metade (42%) de vacinas contra o câncer sendo investigados são direcionadas para o tratamento do câncer cervical. Os restantes 32% de ensaios clínicos registrados ou ativos estão investigando vacinas para hepatite B e C, gripe e Papilomavírus Humano (HPV) (31).

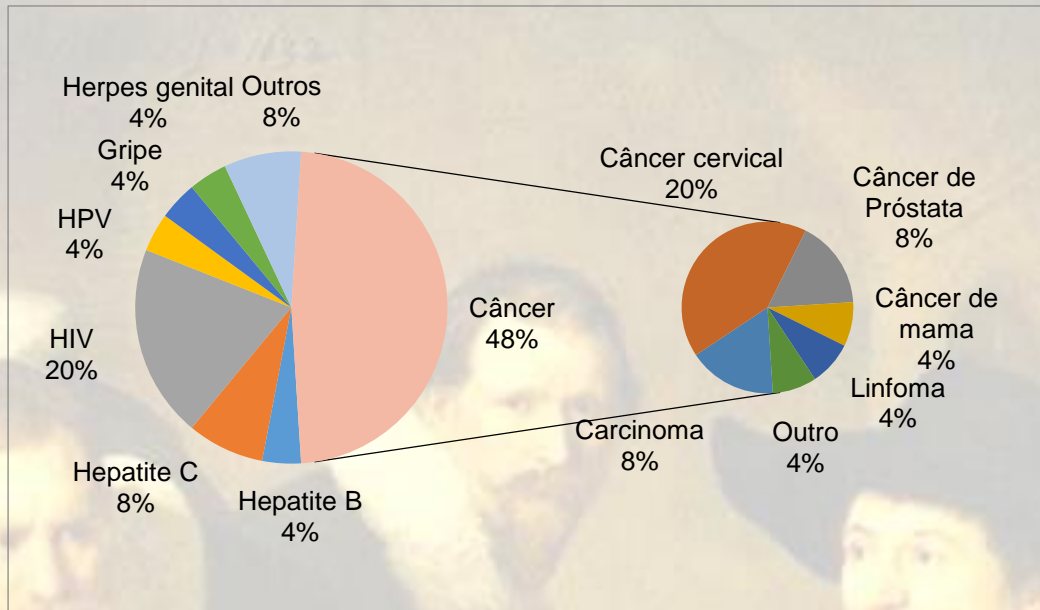


Figura 4: Ensaios clínicos de vacinas de DNA em andamento listados no banco de dados Clinical Trials. O gráfico mostra o percentual de ensaios por alvo da vacina.

Os avanços no design de antígenos, as melhorias nas formulações, a inclusão de adjuvantes moleculares e métodos físicos de entrega tem aumentado a imunogenicidade das vacinas de DNA. Essas melhorias na performance tem impulsionado o interesse nessas vacinas, o que é refletido pelo grande número de pesquisas investigando suas aplicações para prevenção e tratamento de doenças (32).

Os progressos nesta área resultaram no desenvolvimento e comercialização de quatro vacinas de DNA licenciadas, para uso veterinário, sendo duas delas para doenças infecciosas: vacina para vírus do Nilo Ocidental em cavalos (Center for Disease Control and Prevention and Fort Dodge Laboratories - USA) e vírus da necrose hematopoética infecciosa em salmão (Novartis - Canadá). Além disto, uma vacina contra o câncer maligno melanoma em cães (Merial - USA) e uma para terapia relacionada à liberação hormonal do fator de crescimento em suínos (VGX Animal Health - Austrália) também foram aprovados (27).

Ainda assim, a busca por vacinas cada vez mais seguras e eficientes continua com diversas pesquisas na área sejam de vacinas de primeira segunda ou terceira geração.

PANORAMA ATUAL DA VACINOLOGIA NO BRASIL

O Brasil montou nas últimas três décadas uma formidável estrutura de imunização em massa e de produção de vacinas. Avançou-se decisivamente em termos de equidade, em vista do expressivo impacto provocado nas condições de saúde das

camadas mais pobres da população, até então as mais atingidas pelas doenças transmissíveis e excluídas da proteção vacinal. A estratégia da política de saúde brasileira para a área de vacinas certamente é uma das mais bem-sucedidas no interior do grupo de países menos desenvolvidos, acompanhando de forma muito próxima o movimento internacional nas últimas décadas (33).

O Calendário Básico de Vacinação brasileiro é aquele definido pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI) e corresponde ao conjunto de vacinas consideradas de interesse prioritário à saúde pública do país. Atualmente é constituído por 12 produtos recomendados à população, desde o nascimento até a terceira idade e distribuídos gratuitamente nos postos de vacinação da rede pública (34).

O PNI foi criado em 1973 e seu objetivo prioritário era contribuir para o controle da poliomielite, do sarampo, da tuberculose, da difteria, do tétano e da coqueluche, e para a manutenção da situação de erradicação da varíola. Inicialmente o programa priorizava as populações urbanas e áreas rurais viáveis de cobertura imediata. Na década de 1990, o PNI passou a perseguir a homogeneidade de coberturas vacinais adequadas, buscando o cumprimento de metas por todos os municípios brasileiros (35).

Atualmente, são objetivos prioritários do PNI contribuir para a manutenção da situação de erradicação da febre amarela urbana, da poliomielite e do sarampo, zerar os casos de tétano neonatal; manter o controle da tuberculose em suas formas graves, da difteria, do tétano acidental, da coqueluche, da febre amarela silvestre e da raiva humana; alcançar e manter o controle das infecções pneumocócicas e suas complicações, das infecções por *Haemophilus influenzae* tipo B, da rubéola e da síndrome da rubéola congênita, da hepatite B e da caxumba na população idosa; contribuir para o controle de doenças imuno-preveníveis e suas complicações na parcela populacional portadora de condições clínicas específicas e para o controle de surtos ocasionais de doenças e de acidentes com animais peçonhentos (35).

As vacinas que integram atualmente o Calendário Nacional de Vacinação são: (a) BCG; (b) Hepatite B recombinante; (c) Vacina adsorvida difteria, tétano, *B. pertussis*, hepatite B recombinante e *Haemophilus influenzae* B conjugada - Penta; (d) Vacina adsorvida difteria, tétano e *pertussis* - DTP; (e) Vacina poliomielite 1, 2 e 3 inativada e vacina poliomielite 1, 2 e 3 atenuada - VIP e VOP; (f) vacina pneumocócica 10-valente conjugada - Pneumo 10; (g) Vacina rotavírus humano G1P1 atenuada; (h) Vacina meningocócica C conjugada; (i) Vacina febre amarela atenuada; (j) Vacina sarampo, caxumba e rubéola - Tríplice viral; (k) Vacina sarampo, caxumba, rubéola e varicela - Tetra viral; (l) Vacina adsorvida difteria e tétano adulto – dT (36).

Em 2003, dos 44 produtos imunobiológicos adquiridos pelo PNI, 27 eram produzidos com autossuficiência no país (61,3%), 5 estavam em fase de transferência de tecnologia (11,4%) e 12 produtos eram importados (27,3%) (35).

Há um esforço coletivo entre os produtores nacionais visando a nacionalizar a produção de novas vacinas, no menor prazo e ao menor preço, de sorte a possibilitar sua introdução no calendário vacinal. A Política Nacional de Biotecnologia e o Programa Nacional de Competitividade em Vacinas (INOVACINA) são iniciativas nessa direção. Esses dois marcos definem quais as vacinas prioritárias, o que permite induzir projetos de desenvolvimento orientados para produtos. Fontes de fomento estão sendo especialmente criadas para esses projetos e, por seu turno, os produtores nacionais estão reformando seus modelos de gestão adotando ferramentas para inovação. O cenário é promissor, mas fundamental é garantir que as políticas e programas para esse segmento sejam mantidos para que o Brasil se torne autônomo no desenvolvimento e produção das vacinas que interessam ao país (37).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existe atualmente uma demanda no mundo inteiro por novas vacinas, seja de forma a aprimorar vacinas já existentes ou buscar novas alternativas de tratamento e profilaxia para os principais problemas de saúde pública atuais. No Brasil tem se desenvolvido programas visando à autossuficiência na produção de vacinas, de modo a reduzir gastos públicos com vacinas importadas e focar especificamente em problemas epidemiológicos nacionais.

As novas técnicas da biotecnologia moderna, em particular a disseminação das técnicas de DNA recombinante e manipulação genética, tem contribuído de diferentes maneiras na pesquisa e desenvolvimento das vacinas de primeira, segunda ou terceira geração. Tornou-se possível o aperfeiçoamento de processos relacionados a produção de novas vacinas e também a melhoria das já existentes para que se tornem mais seguras e eficazes.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CDSA (Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido) pelo apoio à pesquisa e ao CNPq - Brasil (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de estudo concedida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Balestieri F. Imunologia. Barueri, SP: Manole; 2006.
2. Silva A, Rodrigues S, Coelho M. Vacina gênica como alternativa no tratamento de enfermidades na medicina veterinária. XIII Jornada De Ensino, Pesquisa e Extensão – JEPEX 2013. UFRPE; 2013.
3. Silva C. O impacto sobre o controle das doenças infecciosas. Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento. 1997;3.
4. Bloom B. New approaches to vaccine development. Review of Infectious Diseases. 1989;11(Supplement 2):460--466.
5. Waine G, McManus D. Nucleic acids: vaccines of the future. Parasitology Today. 1995;11(3):113--116.
6. Diniz M, Ferreira L. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. Estudos Avançados. 2010;24(70):19--30.
7. Kano F, Vidotto O, Vidotto M. Vacina de DNA: aspectos gerais e sua aplicação na medicina humana e veterinária. Semina: Ciências Agrárias. 2007;28(4):709--726.
8. Crepe CA. Introduzindo a Imunologia: Vacinas. Apucarana, 2009.
9. Tavares NM, Santos DM, Oliveira CI, Brodskyn CI. Estratégias de Vacinação contra Leishmaniose Visceral e Cutânea: Lições dos modelos experimentais. Gaz. méd. Bahia, 2009;79 (Supl.3):110-121.
10. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. Vacines. No Imunologia. 5a Ed. Editora Mc Graw Hill; 2004. p. 437-454.
11. Ellis RW. New and improved vaccines against Hepatitis B. I. Recombinant derives hepatitis B vaccine. In: Woodrow GC, Levine MM. New generation vaccines. Marcel Dekker Inc., 1990; 439-447.
12. Chen R, Rastogi S, Mullen J, Hayes S, Cochi S, Donlon J et al. The vaccine adverse event reporting system (VAERS). Vaccine. 1994;12(6):542--550.
13. Ribeiro OMF. O uso de nanopartículas de quitosano, revestidas com alginato como adjuvante do antígeno da hepatite B na vacinação através das mucosas oral e nasal. [Dissertação]. Universidade de Coimbra; 2007.
14. Quintilio W. Proteína de 18kDa de *Wycobacterium leprae*: um modelo de carregadora para vacinas de segunda geração. [Dissertação]. Universidade de São Paulo; 1999.
15. Allison AC, Byars NE. Adjuvats. In: Malik VS, Lilleroj EP. Antibody Techniques, Academic Press Inc., 1994: 141-151.
16. Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, Urban JF, Beckman MP, Park LS, Schookey KA, Coffman RL, Mosmann TR, Paul WE. Lymphokine control os in vivo isotype selection. Annual Reviews of Inmunology, 1990; 8: 303-334.
17. Cox J, Coulter A. Adjuvants—a classification and review of their modes of action. Vaccine. 1997;15(3):248--256.
18. Woodrow GC. An overview of biotechnology as applied to vaccine development. In: Woodrow GC, Levine MM. New generation vaccines. Marcel Dekker Inc., 1990; 439-447.
19. Filho MA. Unicamp testa vacina de segunda geração contra a coqueluche. ANO XXIII. Nº 412. [Internet] Campinas, 2008. [cited 15 October 2014]. Available from: <http://www.saudeemmovimento.com.br>.
20. Linden R. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. Estudos Avançados [Internet]. 2010 [cited 18 October 2014];24(70):31-69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-40142010000300004>
21. Júnior J, Lima K, Castelo A, Martins V, dos Santos S, Accioli L et al. É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculose?. J Bras Pneumol. 2004;30(4):468--77.
22. Wolff J, Malone R, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science. 1990;247(4949):1465--1468.
23. Hasan U, M Abai A, Harper D, Wren B, Morrow W. Nucleic acid immunization: concepts and techniques associated with third generation vaccines. Journal of immunological methods. 1999;229(1):1--22.

24. Ulmer J, Donnelly J, Parker S, Rhodes G, Felgner P, Dwarki V et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*. 1993;259(5102):1745--1749.
25. Leitner W, Ying H, Restifo N. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine*. 1999;18(9):765--777.
26. Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993; 90: 11478.
27. Pereira VB. Construção e avaliação funcional de um plasmídeo vacinal para a expressão do antígeno ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis* em células mamíferas, utilizando uma bactéria láctica invasiva como veículo carreador. [Dissertação]. Universidade Federal de Minas Gerais; 2011.
28. Henke A. DNA immunization--a new chance in vaccine research?. *Medical microbiology and immunology*. 2002;191(3-4):187--190.
29. Silva C. Estudos de novas vacinas e terapia gênica contra tuberculose [Internet]. Biblioteca Virtual FAPESP. 2002 [cited 18 October 2014]. Available from: <http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/1544/estudos-de-novas-vacinas-e-terapia-genica-contratuberculose/>
30. Isto é. A revolução da terapia genética. [Internet]. 2014 [cited 18 October 2014]. Available from: http://www.istoe.com.br/reportagens/270736_A+REVOLUCAO+DA+TERAPIA+GENETICA
31. Clinical Trials. Search of: "dna vaccine" | Open Studies - List Results - ClinicalTrials.gov [Internet]. 2014 [cited 18 October 2014]. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=%22dna+vaccine%22&recr=Open&map=SA&pg=2>
32. Ferraro B, Morrow M, Hutnick N, Shin T, Lucke C, Weiner D. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. *Clinical infectious diseases*. 2011;53(3):296--302.
33. Gadelha C, Azevedo N. Inovação em vacinas no Brasil: experiência recente e constrangimentos estruturais. *História, Ciências, Saúde — Manguinhos*, 2003; 10(suplemento 2): 697-724.
34. SBIM - Sociedade Brasileira de Imunizações. Vacinação [Internet]. 2014 [cited 18 October 2014]. Available from: <http://www.sbim.org.br/vacinacao/>
35. Temporão JG, Leite MV, Maia MLS. Programa Nacional de Imunizações (PNI): história, avaliação e perspectivas. In: Buss M, Temporão JG, Carvalheiro JR. *Vacinas, Soros & Imunizações no Brasil*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. 2005.
36. Secretaria de Educação de Pernambuco. [Internet]. 2014 [cited 18 October 2014]. Available from: <http://www.educacao.pe.gov.br/portal/>
37. Homma A, Moreira M. Novos desafios para capacitação tecnológica nacional de vacinas: inovação tecnológica autóctone e transferência de tecnologia. *Cad Saude Publica*. 2008;24(2):238--239.
38. NCBI. DNA vaccine[Title/Abstract] OR Third generation vaccines[Title/Abstrac - PubMed - NCBI [Internet]. 2014 [cited 18 October 2014]. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=DNA+vaccine\[Title%2FAbstract\]+OR+Third+generation+vaccines\[Title%2FAbstract\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=DNA+vaccine[Title%2FAbstract]+OR+Third+generation+vaccines[Title%2FAbstract])