

Sofia Maria Oliva Teles Salgado

# Vacinas contra o HIV: Abordagens existentes e perspectivas futuras

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Sofia Maria Oliva Teles Salgado

# Vacinas contra o HIV: Abordagens existentes e perspetivas futuras

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Sofia Maria Oliva Teles Salgado, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010124539, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 7 de Setembro de 2015.

---

Sofia Maria Oliva Teles Salgado

Os meus sinceros agradecimentos:

À Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva por toda a ajuda, compreensão, paciência, simpatia e, principalmente, por me ter ajudado a concretizar uma etapa muito importante da minha vida.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pelas bases e conhecimentos científicos que me proporcionou.

À minha família, mãe, pai e irmãos por terem sido o meu pilar nesta fase tão importante da minha vida, por todo o amor e apoio.

Ao Fábio, por toda a compreensão e paciência e, especialmente, por todo o amor e dedicação.

Aos meus amigos da faculdade, que levarei comigo para sempre no coração, tendo sido o meu porto seguro durante todos os anos de faculdade.

A Coimbra.

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| RESUMO   | 2  |
| ABSTRACT   | 3  |
| 1. INTRODUÇÃO  | 4  |
| 2. VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)                            | 5  |
| 2.1 Estrutura e Replicação   | 5  |
| 2.2 Interação vírus – célula   | 7  |
| 2.3 Infecção por HIV – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) | 7  |
| 3. RESPOSTAS IMUNES CONTRA A INFEÇÃO POR HIV                         | 9  |
| 3.1 Resposta Imune Mediada por Células                               | 9  |
| 3.2 Neutralização por Anticorpos                                     | 11 |
| 4. VACINAS CANDIDATAS CONTRA O HIV                                   | 12 |
| 4.1 Vacinas de Vírus Vivos Atenuados                                 | 13 |
| 4.2 Vacinas de Vírus Inativados ou Mortos                            | 14 |
| 4.3 Vacinas de sub-unidades  | 15 |
| 4.3.1 Vacinas compostas por proteínas do envelope do HIV             | 15 |
| 4.3.2 Vacinas compostas por proteínas <i>Tat</i>                     | 16 |
| 4.4 Vacinas de DNA   | 16 |
| 4.5 Vacinas de vetores recombinantes (vetores vivos)                 | 17 |
| 4.6 Vacinas de péptidos sintéticos                                   | 19 |
| 4.7 Vacinas das mucosas  | 20 |
| 4.8 Vacinas de regime “Prime-Boost”                                  | 21 |
| 4.8.1 Vacinas “Prime-Boost” de DNA e vetor vivo recombinante         | 21 |
| 4.8.2 Vacinas “Prime-Boost” de dois vetores vivos recombinantes      | 21 |
| 4.8.3 Vacinas “Prime-Boost” de vetor vivo recombinante e proteína    | 22 |
| 4.8.4 Vacinas “Prime-Boost” de DNA e proteína                        | 22 |
| 5. RESUMO E PERSPETIVAS FUTURAS                                      | 23 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS  | 25 |

## ABREVIATURAS

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>Ad5</b>             | Adenovírus do tipo 5                          |
| <b>Ad5r</b>            | Adenovírus do tipo 5 recombinante             |
| <b>Ad11</b>            | Adenovírus do tipo 11                         |
| <b>Ad26</b>            | Adenovírus do tipo 26                         |
| <b>Ad35</b>            | Adenovírus do tipo 35                         |
| <b>Ad48</b>            | Adenovírus do tipo 48                         |
| <b>ART</b>             | <i>Anti-Retroviral Therapy</i>                |
| <b>CCR-5</b>           | <i>C-C Chemokine Receptor type 5</i>          |
| <b>CXCR-4</b>          | <i>C-X-C Chemokine Receptor type 4</i>        |
| <b>Gp</b>              | Glicoproteína                                 |
| <b>HIV</b>             | <i>Human Immunodeficiency Virus</i>           |
| <b>IL-2</b>            | Interleucina-2                                |
| <b>MAV</b>             | <i>Modified Vaccinia Ankara</i>               |
| <b>MHC</b>             | <i>Major Histocompatibility Complex</i>       |
| <b>RNA<sub>m</sub></b> | RNA mensageiro                                |
| <b>RNA<sub>t</sub></b> | RNA transferência                             |
| <b>RT</b>              | Reverse Transcriptase                         |
| <b>SIDA</b>            | Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida |

## RESUMO

Desde o primeiro conhecimento da epidemia do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), em 1981, estima-se que mais de 60 milhões de pessoas contraíram a doença, havendo atualmente cerca de 33 milhões de pessoas infectadas. Por dia, surgem cerca de 7 mil novas infecções, sendo que a maioria delas ocorrem em contextos de recursos limitados, onde o acesso a cuidados e tratamento adequado é escasso. Por ano, morrem cerca de 2 milhões de pessoas, sendo a sexta maior causa de morte do mundo hoje em dia. Apesar dos progressos notáveis no desenvolvimento de Terapias Anti-Retrovirais (ART) e os recentes avanços em novas tecnologias de prevenção, a taxa de novas infecções pelo HIV continua a superar os esforços de prevenção e controle do HIV. É portanto de máxima importância e prioridade encontrar uma forma de controlar esta epidemia, desenvolvendo uma vacina segura e eficaz contra o HIV.<sup>1, 2</sup>

Ao longo de 30 anos de pesquisa e esforço ainda não foi possível encontrar uma vacina que seja eficaz na erradicação do vírus, sendo por isso, atualmente, o desenvolvimento da mesma uma prioridade global. No entanto, avanços recentes têm impulsionando as pesquisas para uma direção que levará, possivelmente, a uma vacina eficaz, muito em parte pela melhor compreensão da patogênese e imunidade do hospedeiro contra o vírus. Esses avanços incluem a descoberta de novos alvos de anticorpos amplamente neutralizantes capazes de evitar a infecção, bem como a evidência de que os linfócitos T CD8 podem controlar a infecção por HIV. Porém, a indução de respostas imunes eficazes contra a inédita hiper-variabilidade do HIV em circulação no mundo ainda representa um grande desafio.<sup>2-5</sup>

## **ABSTRACT**

More than 60 million people have contracted the Human Immunodeficiency Virus (HIV) since the first knowledge of this epidemic disease dated back from 1981, with around 33 million of those being currently infected. Each day, there are about 7 thousand new cases, with the majority of them linked to an overall lack of resources like scarce access to care and treatment. Each year, about 2 million of people die from the disease, being currently the sixth biggest cause of death in the world. Despite the major achievements in developing anti-retroviral therapies and recent breakthroughs in prevention technologies, the rate of new HIV infections continues to overcome the prevention and control efforts. Therefore, is of the utmost importance and priority to find a way of controlling this epidemic disease, developing for the effect a secure and efficient vaccine against the HIV.<sup>1, 2</sup>

Over 30 years of effort and research it still has not been possible to find a vaccine that can eradicate efficiently the virus, thus being its development one of the world's top priorities. However, recent breakthroughs have lead researchers closer to find an efficient vaccine, mostly due to a better understating of the pathogenesis and host's immunity against the virus. These breakthroughs include the finding of new groups of broadly neutralizing antibodies capable of preventing the infection as well as evidence that T CD8 lymphocytes can prevent HIV infection. Nevertheless, the introduction of effective immune reactions against the unprecedented hyper-variability of the HIV spread around the world still represents a major challenge.<sup>2-5</sup>



## I. INTRODUÇÃO

A Terapia Anti-Retroviral (ART) tem demonstrado uma significativa e efetiva redução da morbidade e mortalidade associada à infecção por HIV, diminuindo a presença do síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) e, por conseguinte, aumentando a esperança média de vida dos indivíduos infetados. Assim, temos, atualmente, um maior número de pessoas infetadas com HIV. No entanto, esta terapia não é suficiente para erradicar o vírus do organismo o que está a levar a um aumento das resistências aos fármacos bem como a um aumento da toxicidade dos mesmos. Tendo em conta este cenário, a melhor hipótese para controlar a epidemia do HIV seria desenvolver uma vacina que prevenisse a replicação viral, ultrapassando as limitações da terapia atualmente existente. Para além disso acrescenta-se a vantagem de que uma única administração da vacina, em princípio, seria suficiente para erradicar a infecção, não estando dependente da ação humana, como acontece com todos os métodos de prevenção e terapia atualmente existentes. Assim sendo, é uma necessidade urgente e uma prioridade de saúde pública desenvolver uma vacina altamente eficaz que evite a infecção por HIV, o que é conseguindo se for proporcionado uma resposta imune específica e vigorosa, quer celular quer humoral.<sup>6-9</sup>

Apesar de diversas vacinas terem sido já avaliadas e testadas quer em termos de segurança quer em termos de imunogenicidade, nenhuma está próxima de um futuro uso clínico devido aos inúmeros desafios que decorrem do desenvolvimento de uma vacina para o HIV. Tudo começa pela falta da total compreensão das respostas imunes contra o HIV e pela capacidade limitada para induzir respostas imunes naturais potencialmente protetoras através da vacinação que impeçam a infecção por HIV. A adicionar a estas barreiras, inclui-se a falta de um modelo animal validado (modelo atualmente usado (primatas não humanos, nomeadamente o macaco e o chimpanzé) é limitado no que diz respeito à mimetização da infecção e à progressão da doença em humanos, para além de ser também limitado em relação à hiper-variabilidade do HIV<sup>10</sup>), bem como o facto de o HIV ter a capacidade de integrar o seu genoma nos cromossomas das células que infeta, criando um reservatório de vírus no hospedeiro, podendo ficar em estado latente durante longos períodos de tempo.<sup>11</sup> Outro desafio a ultrapassar no desenvolvimento de uma vacina contra o HIV é a rápida taxa de replicação deste, a qual, acoplada a uma elevada taxa de mutação, devido aos erros sucessivos da transcriptase reversa (RT), leva ao aparecimento de uma enorme variabilidade genética, escapando assim às respostas do sistema imune. Assim, apenas as estirpes mutantes que escapam às respostas do sistema imune continuam no organismo devido à pressão imunológica sobre a população de vírus, aplicada pelos linfócitos T CD8 específicos do HIV.<sup>12</sup>

Conclui-se assim que as abordagens para o desenvolvimento de uma vacina com objetivo da proteção global contra o HIV, devem encontrar uma maneira de combater a diversidade viral existente. Todos estes desafios a ser ultrapassados impedem o progresso científico. No entanto, avanços estão a ser feitos no sentido de serem desenvolvidas novas vacinas candidatas que sejam capazes de proporcionar uma proteção parcial em certos modelos de primatas não humanos.<sup>1, 3, 4, 7, 9, 13, 14</sup>

Em suma, a característica mais crítica do HIV é a velocidade de adaptação do mesmo, quer na capacidade de estabelecer rapidamente uma grande população viral geneticamente flexível e adaptável às respostas imunes do hospedeiro, quer na capacidade de gerar rapidamente variantes virais capazes de replicar, em resposta a pressões ambientais de seleção. Esta estratégia mantém o vírus um passo à frente do exército imunológico do hospedeiro, criando assim uma infecção permanente.<sup>12</sup>

## **2. VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)**

O HIV é um lentivírus, que pertence à família *Retroviridae*. Existem dois agentes etiológicos da SIDA, o HIV-1 e o HIV-2, no entanto o HIV-2 é menos agressivo e tem menor distribuição geográfica, daí que a maioria dos estudos se foquem no HIV-1. É transmitido essencialmente por via sexual, mas também por contacto com sangue ou produtos derivados infetados e por transmissão vertical (durante a gravidez, parto ou amamentação). Provoca uma depleção progressiva de linfócitos T CD4, que são o alvo principal do vírus, resultando num síndrome de imunodeficiência que torna o indivíduo mais suscetível a infeções oportunistas, como a tuberculose pulmonar, pneumonia, toxoplasmose, candidíase e uma variedade de infeções virais e cancro.<sup>14, 15</sup>

### **2.1 Estrutura e Replicação**

Os lentivírus são vírus de RNA envelopados que produzem tipicamente infeções lentas e progressivas, uma vez que o vírus consegue passar longos períodos de latência, persistindo apesar de todas as respostas imunes exercidas pelo organismo. O genoma do HIV é constituído por duas cópias de RNA que codifica proteínas estruturais retrovirais típicas: Gag (quando clivada dá origem à proteína da matriz, cápside e nucleocápside), Pol (após clivagem origina uma protease, uma RT e uma integrase) e Env (glicoproteína que quando clivada origina a gp 120 (superfície) e a gp41 (transmembranar)). Para além destas proteínas são também codificadas proteínas não estruturais, como as proteínas reguladoras: Tat

(ativador da transcrição) e Rev (regulador da expressão de proteínas virais) e as proteínas acessórias: Nef, Vif, Vpr e Vpu.<sup>7, 14-16</sup> (Fig. 1)

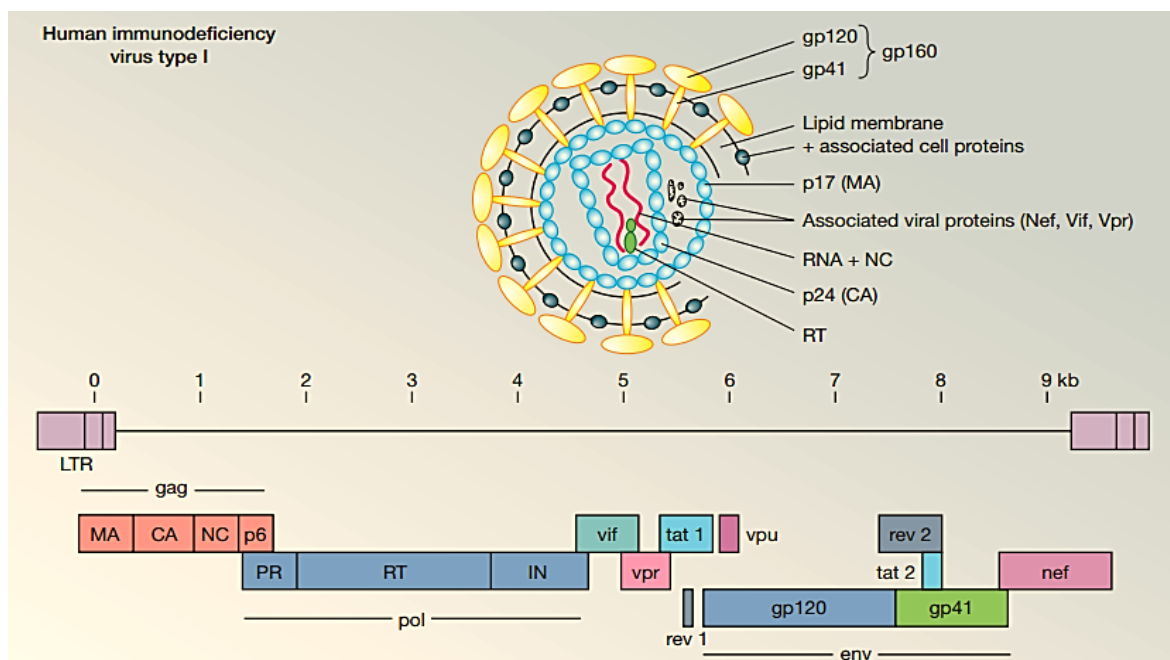


Fig. 1 – HIV -1: Organização do genoma e estrutura do viriônio<sup>14</sup>.

A sua replicação depende da presença de uma RT que transforma o genoma de RNA numa cópia de DNA proviral com capacidade de se integrar nos cromossomas das células infetadas do hospedeiro, com a ajuda da integrase. Já integrado no cromossoma da célula hospedeira, é produzido RNAm que codifica proteínas virais. Estas, juntamente com o genoma, vão ser posteriormente encapsuladas originando novos viriões.<sup>7, 14, 16</sup>

Os viriões formados vão emergir da célula infetada por exocitose, formando o envelope viral a partir da membrana plasmática da célula hospedeira. No entanto, emergem ainda na forma não infecciosa, uma vez que possuem a poliproteína Gag e a poliproteína Pol intactas. Nesta etapa é novamente fundamental a expressão do gene *Pol* e *Gag*, pois a protease por eles codificada vai clivar a poliproteína Gag e a Pol, levando a um rearranjo morfológico que conduzirá à formação do vírus maduro e infeccioso. O virião maduro consiste numa cápside em forma de cone truncado constituído por proteínas da cápside e rodeado pela proteína da matriz, que por sua vez é envolta por um invólucro lipídico viral. A cápside do vírus contém duas cópias do genoma de (+)ssRNA associado com à proteína da nucleocápside, que juntamente com as moléculas de RNAt servem de iniciadores para a transcrição reversa.<sup>14, 16</sup>

## 2.2 Interação vírus – célula

A entrada do HIV nas células é determinada pela porção gp120 através de um processo complexo que envolve várias etapas. Inicialmente a gp120 interage com fatores de fixação e liga-se ao recetor CD4, o que leva a uma alteração conformacional que expõe o local de ligação ao co-recetor. Assim, a gp120 liga-se a um dos 19 co-recetores possíveis, sendo os mais usuais o CCR-5 ou o CXCR-4 (Fig. 2). A ligação da gp120 ao co-recetor, por sua vez, desencadeia mudanças conformacionais na gp41, resultando na exposição do péptido de fusão, que conduz à fusão do envelope viral com a membrana celular. O HIV pode, portanto, entrar em todas as células que contenham o recetor CD4 e um dos 19 co-recetores possíveis, sendo essas células os linfócitos T CD4 (principal alvo), macrófagos, monócitos, células dendríticas e outros linfócitos. A escolha do co-recetor é em grande parte dependente da sequência de aminoácidos da gp120, que, portanto, determina qual o tipo de células o vírus pode infectar.<sup>7, 9, 11, 14, 16</sup>

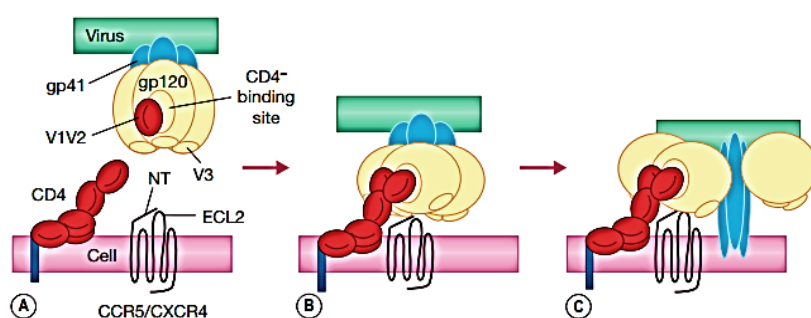


Fig. 2 – Interação da gp 120 com os recetores celulares<sup>14</sup>.

As células infectadas podem seguir um ciclo lítico, onde há morte celular no final do processo, ou então podem ficar na forma latente, funcionando como reservatórios da infecção, escapando às respostas do sistema imune. Se houver ativação destas células que funcionam como reservatório vai haver um aumento da divisão celular que é acompanhado com um aumento da virémia.<sup>7</sup>

## 2.3 Infecção por HIV – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA)

A infecção pelo HIV provoca alterações profundas e, por vezes, irreversíveis no sistema imune do hospedeiro. Na ausência de Terapia Anti-Retroviral, os linfócitos T CD4 são progressivamente eliminados e os linfócitos T CD8 são frequentemente ativados, assim como a maior parte do sistema imune que é cronicamente ativada.<sup>11</sup>

Em primeiro lugar, a replicação do HIV ocorre num pequeno número de linfócitos T CD4 perto do local de entrada do vírus. Posteriormente, em 80% dos casos, um único clone estabelece uma infecção produtiva expressando numerosos marcadores inflamatórios, iniciando uma cascata inflamatória que conduz a um influxo de potenciais células alvo. Durante este tempo, o vírus vai sofrendo diversas mutações originando várias quasi-espécies, permitindo ao vírus escapar às respostas imunes do hospedeiro. Assim inicia-se a fase aguda da infecção, com uma enorme expansão da replicação viral.<sup>14, 16</sup>

A fase inicial dura apenas alguns dias e é caracterizada por níveis elevados de RNA viral plasmático, que vão depois diminuindo à medida que as respostas imunes do hospedeiro atuam. Acompanhando este parâmetro, há uma diminuição transitória na contagem total de linfócitos T CD4 e um aumento na contagem de linfócitos T CD8. Durante a infecção primária aguda surge também um aumento da antigenemia, especialmente da p24.<sup>14, 16</sup> (Fig. 3)

Um longo período assintomático de latência clínica segue-se uma vez que não há manifestações clínicas inerentes à replicação viral, pois esta é feita a um ritmo mais lento (Fig. 3), sendo, por isso mesmo, a fase em que a transmissão é menos provável de acontecer. Esta corresponde à fase da infecção onde há um declínio lento mas constante no número de linfócitos T CD4 (Fig. 3). Estabelece-se uma resposta imune humoral e o indivíduo torna-se seropositivo. Esta fase tem uma duração variável (meses a vários anos) até ao aparecimento de infeções oportunistas, dependendo da relação entre a carga viral e a diminuição de linfócitos T CD4.<sup>14, 16</sup>

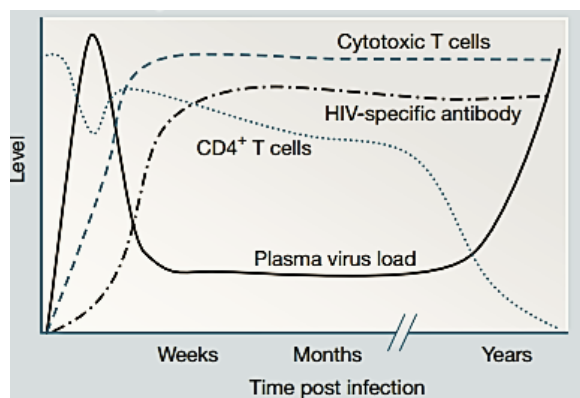


Fig. 3 – Representação da evolução dos marcadores virais e imunológicos durante uma infecção típica de HIV<sup>14</sup>.

Por fim, surge novamente uma fase sintomática que é caracterizada pelo retorno da antigenemia p24, uma elevada carga viral e um número muito reduzido de linfócitos T CD4, bem como uma diminuição da sua eficácia, visto serem o alvo principal do vírus (Fig. 3). A esta fase chama-se Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e desenvolve-se, em média, 8 a 10 anos após um período assintomático. Com a progressão da doença acentuam-se os sintomas (fadiga, perda de peso, suores noturnos) e as infeções oportunistas tornam-se cada vez mais frequentes.<sup>14, 16</sup>

As taxas de progressão do HIV, na ausência completa de tratamento, levam a um declínio da contagem de linfócitos T CD4, como já foi elucidado anteriormente, no entanto esse declínio pode variar entre doentes. Os doentes de “elite” são os “long-term non-progressors”, também chamados de controladores do HIV, pois mantêm uma carga viral indetetável de HIV no soro por longos períodos de tempo, não tendo um declínio na contagem de linfócitos T CD4 perceptível durante esses mesmos períodos.<sup>17</sup>

### **3. RESPOSTAS IMUNES CONTRA A INFEÇÃO POR HIV**

Indivíduos infetados com HIV não conseguem erradicar a infecção e, portanto, há respostas imunes desenvolvidas com o intuito de proteção do organismo. Estas respostas imunes específicas contra o HIV são a base para o desenvolvimento de vacinas, uma vez que a evidência crescente tem demonstrado que as respostas imunes são decisivas para o controlo da replicação viral, embora não se tenha o total conhecimento das mesmas. Apesar do conhecimento sobre a biologia e patogénese do HIV ter aumentado drasticamente ao longo dos últimos 30 anos, uma vacina eficaz, tendo por base a indução de linfócitos T e anticorpos neutralizantes, permanece, ainda, indefinida.<sup>18</sup>

Uma vacina contra o HIV ideal seria eficaz, segura, acessível, tolerada por todos os destinatários e com uma resposta imune de longa duração, que induzisse quer a produção de anticorpos amplamente neutralizantes, quer a ativação de linfócitos T citotóxicos, uma vez que ambos os ramos da imunidade adaptativa são necessários, especialmente quando se lida com vírus altamente variáveis. Acredita-se que os anticorpos iriam funcionar como prevenção da infecção na superfície das mucosas, ao passo que os linfócitos T iriam ter um efeito de controlo da propagação do vírus que escapou à neutralização inicial. Assim, uma só vacina iria ter dois efeitos, um profilático (componente imune humoral) e um de redução da progressão da doença (componente imune celular).<sup>9, 10, 19, 20</sup>

#### **3.1 Resposta Imune Mediada por Células**

As respostas imunes mediadas por células são as primeiras respostas efetoras aquando uma infecção por HIV.<sup>12</sup> Estudos desenvolvidos mostraram que, em indivíduos infetados, a resposta imune mediada por células tem um papel importante na proteção do organismo, uma vez que os linfócitos T CD8 surgem no início da infecção aguda e o seu surgimento é coincidente com o controlo da virémia primária. Para além disso, a depleção dos linfócitos T

CD8 está correlacionado com o aumento da carga viral. Assim sendo, vacinas que induzam a estimulação de linfócitos T, principalmente dos linfócitos T CD8 podem proporcionar um controlo imunológico parcial da replicação do vírus, através da eliminação de células infetadas, pois estes têm capacidade citolítica, retardando assim a progressão da infeção para a SIDA. A eliminação das células infetadas é feita devido à capacidade dos linfócitos T reconhecerem péptidos de HIV (antígenos) quando estes são apresentados pelas células. Estas sequências de péptidos podem ser originadas por clivagem proteolítica do vírus e, portanto, podem incluir proteínas internas do HIV (como as proteínas da nucleocápside) que são mais conservadas, como também proteínas do envelope, que são mais variáveis. Ao reconhecerem estes péptidos, os linfócitos T vão sofrer ativação, eliminando as células infetadas. Para além da eliminação de células infetadas, os linfócitos T citotóxicos vão também produzir citocinas antivirais.<sup>6, 10, 13, 16, 17, 19</sup>

Adicionando a estas evidências, estudos concluíram que indivíduos que têm uma progressão lenta da infeção demonstram ter respostas imunes vigorosas de linfócitos T CD4 e CD8 específicos do HIV, bem como o controlo da replicação viral, sem ser necessário o uso de anti-retrovirais. Estes indivíduos têm linfócitos com uma grande capacidade proliferativa e têm, também, níveis elevados de expressão de perforina (proteína responsável pela lise de células infetadas por um vírus através da formação de um poro na membrana plasmática).<sup>6</sup>

Deve-se, no entanto, sublinhar que nem o número de linfócitos T CD4 nem o de linfócitos T CD8 específicos para o HIV consegue prever a taxa de progressão para a SIDA. Contudo, uma vacina que induza a estimulação de células T poderia levar ao controlo a longo prazo da infeção, desde que gerasse linfócitos T efetores de memória nos locais alvo das mucosas, sendo estes capazes de inibir a replicação viral através da morte de células infetadas.<sup>16</sup> Porém, as vacinas baseadas na ativação de linfócitos T têm uma desvantagem em relação às vacinas que estimulam a produção de anticorpos neutralizantes, uma vez que estas apenas funcionam em células já infetadas, pois só estas vão ser capazes de produzir os antígenos que serão posteriormente apresentados aos linfócitos T pelas células apresentadoras de antígenos, não prevenindo, portanto, a infeção. São, no entanto, de elevado valor no que diz respeito ao controlo de infeções.<sup>16, 17</sup>

Quando se fala da resposta imune mediada por célula no caso da infeção por HIV tem de se ter também em conta o facto do HIV infetar as células do sistema imunológico que estão envolvidas na defesa do hospedeiro contra infeções virais. Tal facto leva ao

comprometimento do sistema de defesa do hospedeiro logo após a infecção, o que favorece a replicação viral persistente em vez do controlo imune do hospedeiro. Este fator só vem reforçar a ideia de que a ativação de linfócitos T através da vacinação possa ser eficaz no controlo da infecção por HIV.<sup>1, 5, 12</sup>

### **3.2 Neutralização por Anticorpos**

Como a maioria das infeções virais, o aparecimento de anticorpos neutralizantes correlaciona-se com a eliminação do vírus e com a proteção subsequente do organismo contra a reinfeção.<sup>21</sup> No entanto, apesar do HIV ter vários domínios neutralizantes, nenhum deles é alvo fácil para os potenciais anticorpos induzidos por uma vacina, devido a diversas razões. Para começar, a produção de anticorpos neutralizantes, como uma resposta imune contra o HIV, aparece apenas várias semanas (8 a 12) após a infecção. Além disso, a maioria dos anticorpos produzidos durante a infecção são não neutralizantes ou neutralizam apenas uma estreita percentagem de estirpes virais. Estes têm, como principais alvos, regiões expostas altamente variáveis do envelope do vírus (gp120 ou gp41), o que leva à formação de anticorpos de baixa amplitude e especificidade. Para acrescentar a estes motivos, o facto da estrutura tridimensional do envelope do HIV ter uma configuração dinâmica também contribui para que diversos ensaios clínicos realizados com anticorpos neutralizantes não tenham sido bem sucedidos. Assim sendo, apesar dos anticorpos neutralizantes estarem presentes no organismo, podem não conseguir eliminar o vírus eficazmente. Para além de todos estes fatores, a elevada taxa de mutação que ocorre com a replicação do vírus torna-o menos sensível à neutralização pelos anticorpos, do que os vírus iniciais, uma vez que evoluem rapidamente para escapar ao sistema imune. Deste modo, os anticorpos neutralizantes formados pelo organismo deixam de reconhecer os antígenos, devido às constantes adaptações do vírus.<sup>8, 9, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 21</sup>

Existem, no entanto, epítomos de neutralização que estão presentes em diversas estirpes, porém pouco acessíveis ao sistema imunitário devido à conformação da molécula (regiões dos epítomos estão cobertas por moléculas de hidratos de carbono), sendo poucos os indivíduos infetados que possuem anticorpos contra estes epítomos (10 a 30%). Estes anticorpos são amplamente neutralizantes e aparecem, em média, 2,5 anos após a infecção em pessoas com maior carga viral no plasma, o que sugere uma necessidade de maturação para a afinidade do anticorpo e de exposição crónica ao antígeno. No entanto, as altas frequências de mutações induzem uma produção variada de anticorpos não neutralizantes



que, por sua vez, diminuem a produção de anticorpos amplamente neutralizantes.<sup>2, 9, 14, 16-19,</sup>

22

Os anticorpos amplamente neutralizantes já investigados são dirigidos contra regiões conservadas do envelope e atuam impedindo a ligação do HIV às células alvo, quer por oclusão do local de ligação ao recetor CD4 ou ao co-recetor CCR-5 ou seja, na gp120, quer por inibição da fusão do envelope viral com a membrana plasmática, ou seja, na gp41.<sup>21</sup> Estudos realizados indicam que a administração passiva destes anticorpos amplamente neutralizantes podem proteger o organismo contra a infeção por HIV, desde que tenham a especificidade apropriada e sejam mantidos em títulos elevados no organismo, uma vez que os anticorpos neutralizantes não são só capazes de eliminar o vírus que anda livre, como também são capazes de trabalhar em cooperação com outros componentes do sistema imunitário para combater as células infetadas.<sup>2, 9, 14, 16-19</sup>

Concluindo, a maioria das vacinas bem sucedidas têm como base a indução de anticorpos amplamente neutralizantes, tentando assim ultrapassar a barreira da hiper-variabilidade do vírus. O isolamento de anticorpos amplamente neutralizantes de indivíduos “long-term non-progressors” infetados com HIV tem dado esperança de que se possa desenvolver uma abordagem baseada em anticorpos, juntamente com estratégias de vacinas baseadas em células T como ferramentas terapêuticas. No entanto, estes doentes, também chamados de controladores de elite correspondem apenas a uma pequena percentagem de doentes infetados com HIV que controlam a replicação viral abaixo dos níveis de deteção.<sup>2, 10, 15, 23</sup>

#### **4. VACINAS CANDIDATAS CONTRA O HIV**

Apesar dos grandes avanços na terapêutica do HIV e das estratégias de prevenção, provavelmente só o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz será capaz de acabar com a epidemia global de HIV. Uma vacina eficaz induz uma resposta imune adaptativa, aquando da sua administração. A resposta efetora converte-se numa resposta de memória e oferece proteção a longo prazo contra futuros antigénios similares.<sup>21</sup> Assim, a indução de imunidade duradoura e potente vai impedir a aquisição de infeção e/ou reduzir a replicação do vírus em indivíduos já infetados, diminuindo a transmissão viral. As primeiras vacinas desenvolvidas contra o HIV foram baseadas na indução de anticorpos neutralizantes e na indução de respostas imunes celulares. No entanto, estudos recentes têm demonstrado a necessidade de criar vacinas que possam induzir respostas imunes mais potentes do que aquelas provocadas pela infeção natural, visto que esta última confere uma imunidade

protetora inadequada. Tendo em conta que as estratégias de vacinas clássicas baseadas em vírus vivos atenuados ou vírus inteiros inativados têm mostrado sérias limitações, a maioria dos esforços para desenvolver vacinas contra o HIV concentram-se em abordagens de vacinas mais recentes.<sup>14, 16</sup> Uma vacina contra o HIV ideal seria aquela que impedisse a infeção em quase 100% dos vacinados, barata e facilmente administrada, estável em quase todas as condições ambientais, segura e com um efeito ao longo da vida. Para além de oferecer proteção contra a infeção, é uma mais-valia que a vacina impeça o curso natural da doença após a infeção, reduzindo a morbidade e a mortalidade associadas à infeção por HIV.<sup>17</sup> Estudos recentes têm mostrado que a imunidade robusta da mucosa, os linfócitos T de alta avidéz polifuncionais e os anticorpos amplamente neutralizantes são fatores importantes da imunidade protetora contra o HIV.<sup>16</sup>

Contudo, apesar de mais de 50 candidatos de vacinas contra o HIV terem sido estudadas em mais de 30.000 voluntários saudáveis não infetados desde 1987, apenas quatro conceitos de vacina foram testadas quanto à eficácia clínica ao longo dos últimos 30 anos, sendo elas uma vacina de gp120 recombinante; uma vacina de vetor vivo de adenovírus tipo 5 recombinante que continha os genes *Gag*, *Pol* e *Nef* do HIV; uma vacina “Prime-Boost” constituída por um vetor vivo de canarypox recombinante e por uma gp120, utilizada como reforço; por último uma vacina “Prime-Boost” constituída por uma vacina de DNA seguida de um vetor vivo de Adenovírus tipo 5 recombinante. As duas primeiras vacinas que foram testadas falharam na prevenção da aquisição da infeção por HIV. Já a vacina “Prime-Boost” constituída por canarypox e gp120 teve, pela primeira vez, uma taxa de sucesso na prevenção da aquisição da infeção em 31.2% dos indivíduos. A última vacina estudada conferiu apenas proteção parcial contra a aquisição da infeção por HIV.<sup>1, 10, 13, 24</sup>

#### **4.1 Vacinas de Vírus Vivos Atenuados**

As vacinas de vírus vivos atenuados apresentam antigénios de uma maneira muito semelhante à infeção normal (através das moléculas MHC de classe I), estimulando assim uma ampla variedade de respostas imunes humorais e celulares no indivíduo. Estas vacinas produzem, não apenas respostas de linfócitos T CD4, como também respostas de linfócitos T CD8.<sup>17</sup> No caso concreto do HIV a principal preocupação no desenvolvimento de uma vacina viva atenuada é a segurança.<sup>13, 22</sup>

Estes vírus são atenuados através de tratamentos químicos que são capazes de remover a capacidade replicativa.<sup>17</sup> Uma das abordagens realizadas baseia-se na deleção do gene *Nef*,

que leva à formação de um vírus mutante de HIV sem patogenicidade, que vai induzir uma resposta imune celular duradoura. No entanto, apesar de em alguns testes os resultados terem sido bem sucedidos, noutros os modelos animais utilizados contraíram a doença, ilustrando assim os riscos inerentes a esta abordagem. Conclui-se, que esta vacina pode proteger os indivíduos contra a doença através do impedimento da replicação descontrolada do vírus, no entanto, não os protege da infeção. Na verdade, uma vacina constituída pelo HIV com deleção no gene *Nef* não é totalmente atenuada, podendo causar SIDA.<sup>16</sup> Deleções ou mutações adicionais poderiam atenuar ainda mais a virulência, no entanto à custa da eficácia protetora. Tendo em conta estes resultados e acrescentando o facto da alta taxa de mutação do vírus constituir uma elevada preocupação de segurança, atualmente não existem ensaios clínicos com vacinas de vírus vivos atenuados.<sup>13, 14</sup>

#### **4.2 Vacinas de Vírus Inativados ou Mortos**

As vacinas preparadas através de vírus inteiros inativados ou mortos podem ser particularmente vantajosas quando os parâmetros de imunidade não estão ainda bem definidos e, por conseguinte, os antígenos críticos são difíceis de prever. Este tipo de vacinas, em comparação com vacinas de subunidade (referidas em seguida), fornece a inclusão de um maior número de epítomos imunológicos potencialmente relevantes. No caso do HIV, esta abordagem tem sido pouco estudada, uma vez que há um perigo acrescido devido ao facto desta vacina conter o material genético do vírus, sendo maior o risco de transmissão do HIV. Contudo, há técnicas que permitem eliminar o ácido nucleico, sendo estas de extrema sensibilidade. Porém, o facto de estas vacinas não terem muita capacidade de gerar anticorpos amplamente neutralizantes ou respostas específicas dos linfócitos T CD8 fez com que se fosse abandonando cada vez mais a ideia de sucesso para este tipo de vacinas.<sup>13</sup>

## **4.3 Vacinas de sub-unidades**

### **4.3.1 Vacinas compostas por proteínas do envelope do HIV**

As vacinas compostas por proteínas do envelope do HIV foram submetidas a uma extensa avaliação em seres humanos pelo facto dos epítomos dos anticorpos neutralizantes mais importantes, bem como os epítomos dos linfócitos T, terem sido identificados nas proteínas do envelope do HIV.<sup>13</sup> Estas vacinas foram geradas através de um sistema de expressão de DNA recombinante, o que fornece um meio eficiente para preparar grandes quantidades de proteína purificada, ignorando as preocupações sobre possíveis contaminações com outros componentes do HIV. Estas proteínas foram geradas a partir de estirpes de HIV adaptadas em laboratório, com vários tipos de vetores e sistemas de células, incluindo insetos, leveduras e culturas de células de mamíferos. No entanto, as proteínas recombinantes podem ter diferenças importantes quando comparadas com os seus análogos naturais, diferenciando-se na estrutura terciária, glicosilação e oligomerização.<sup>13</sup>

Várias vacinas candidatas foram avaliadas em ensaios com humanos, sendo a maioria baseada em proteínas que constituem o envelope do HIV, como por exemplo a gp160, a gp120 e a gp41. Algumas destas vacinas chegaram a ser estudadas em ensaios de eficácia na Fase III na sua forma solúvel utilizando alumínio como adjuvante. No entanto mantém-se o obstáculo da incapacidade de indução de anticorpos amplamente neutralizantes, uma vez que este tipo de vacinas é apenas capaz de proteger contra homólogos da mesma estirpe que originou as proteínas, não protegendo contra outras estirpes do vírus.<sup>5, 13, 14, 16</sup>

Numerosas abordagens têm sido desenvolvidas desde então, para tentar melhorar a qualidade e a imunogenicidade das proteínas do envelope para que estas consigam induzir anticorpos amplamente neutralizantes contra o HIV. Atualmente nenhuma das abordagens tem sido bem sucedida na geração destes anticorpos, tanto em estudos pré-clínicos como em estudos clínicos, apesar dos esforços. Continua-se na tentativa da descoberta da melhor abordagem para conseguir, de forma eficiente, produzir títulos elevados de anticorpos amplamente neutralizantes, que sejam eficazes contra várias estirpes do HIV.<sup>13, 14</sup>

Uma nova abordagem desenvolvida é a produção de trímeros de proteínas do envelope derivadas de várias estirpes de HIV, na esperança de que essas vacinas multivalentes venham a alargar o espectro de anticorpos neutralizantes.<sup>13, 14, 16</sup>

### **4.3.2 Vacinas compostas por proteínas *Tat***

O gene *Tat* codifica uma proteína que impede a terminação prematura da transcrição do provírus através da ligação à extremidade 5 das moléculas de RNAm virais, aumentando a produção de RNAm viral centenas de vezes. Para além disso, a proteína *Tat* contribui para a patogénese viral e imunossupressão durante a infeção devido à indução da apoptose de linfócitos não infetados.<sup>14, 16</sup>

Vacinas de subunidades baseadas na proteína acessória *Tat* foram desenvolvidas na esperança de que as respostas imunes dirigidas a esta proteína levassem à interrupção precoce do ciclo de replicação do vírus, uma vez que a proteína *Tat* é produzida prematuramente, impedindo assim a infeção. Tal desenvolvimento foi efetuado tendo por base o facto de haver baixa virémia e progressão lenta da infeção para a SIDA em indivíduos infetados que apresentam anticorpos anti-*Tat*.<sup>14, 16</sup>

Uma nova abordagem foi desenvolvida através do desenvolvimento de uma proteína de fusão *Tat-Nef* que foi combinada com a subunidade gp120. Resultados vantajosos foram conseguidos, tendo a vacina prevenido o desenvolvimento da doença em macacos durante 2,5 anos, a seguir à exposição ao vírus, especialmente quando apresentados numa formulação de vacina de DNA. Concluindo, vacinas contra o HIV baseadas na proteína *Tat* podem mostrar uma melhor eficácia quando combinados com outros antigénios de HIV.<sup>14, 16</sup>

### **4.4 Vacinas de DNA**

A imunização intramuscular de plasmídeos bacterianos purificados, não vivos, não replicantes e não transmissíveis que transportam o gene que codifica os antigénios de interesse, tem demonstrado induzir ambas as respostas imunitárias humoral e celular específicas contra o antigénio codificado. Estas vacinas consistem apenas em componentes de interesse imunológico, sendo as proteínas produzidas e posteriormente apresentadas através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I, induzindo assim a ativação dos linfócitos T CD8 citotóxicos que vão controlar a infeção. Este tipo de vacinas é, em geral, seguro, uma vez que não há o risco de integração do genoma na célula hospedeira.

9, 13, 14, 16, 22

As vacinas que estimulam respostas imunes celulares não vão proteger o indivíduo contra a infeção, mas vão proteger contra o aparecimento da doença por redução da carga viral através do controlo da replicação do vírus e pela redução do declínio de linfócitos T

CD4, prevenindo, também, o retardamento dos sintomas. Obtendo estas respostas, consegue-se também reduzir a probabilidade de transmissão do vírus.<sup>14, 16</sup>

Estudos iniciais das vacinas de DNA sugerem níveis relativamente baixos de imunogenicidade, induzindo fracas respostas celulares e poucos ou nenhum anticorpo, devido a uma baixa eficiência na transfecção e a uma baixa transcrição do antigénio. No entanto, a utilização de genes sintéticos com codões otimizados acoplado a sucessivas injeções tem tido uma expressão mais eficiente do produto dos genes.<sup>13, 15, 16, 22</sup>

Para aumentar a potência de uma vacina de DNA várias estratégias foram desenvolvidas, como por exemplo novos meios de distribuição (injeção sem agulhas), adsorção do DNA a micropartículas catiónicas, utilização de citocinas adjuvantes como a interleucina-2 (IL-2) e o uso da eletroporação in vivo.<sup>14, 16</sup>

Ainda assim, melhores resultados de imunogenicidade com vacinas de DNA foram obtidos usando uma estratégia de “Prime-Boost” (administração do mesmo antigénio através de diferentes veículos), ou seja, primeiro administra-se uma vacina de DNA, sendo depois seguida por uma imunização de reforço com uma vacina de vetor vivo recombinante ou, em alternativa, com uma vacina de uma subunidade proteica. Com esta abordagem consegue-se uma resposta humoral mais diversificada, com maior avidéz de anticorpos e uma melhor atividade de neutralização.<sup>14, 16, 22</sup>

#### **4.5 Vacinas de vetores recombinantes (vetores vivos)**

O desenvolvimento de vacinas à base de vetores vivos tem recebido uma considerável atenção ao longo dos últimos anos. Estas vacinas são feitas de um vetor viral ou bacteriano vivo, que foi manipulado para expressar uma variedade de antigénios exógenos, no citoplasma da célula alvo, sendo neste caso inserido genes do HIV. Assim, induzem de forma eficiente respostas de linfócitos T CD8 específicos para o HIV, pois após a produção dos antigénios, estes são degradados pelo proteossoma da célula e apresentados pelas moléculas MHC de classe I ou, em alternativa, a célula alvo é fagocitada por células apresentadoras de antigénios, sendo depois os péptidos antigénicos apresentados aos linfócitos T CD8, induzindo assim a resposta imune celular. Para além de induzirem a resposta imune celular, os vetores recombinantes são também capazes de induzir a produção de anticorpos neutralizantes.<sup>13, 14, 16, 22</sup> Este tipo de vacinas pode ser usado individualmente ou num regime “Prime-Boost”, induzindo respostas imunes celulares e humorais.<sup>7</sup>

Contudo, estes vetores podem ter várias desvantagens, sendo uma delas o facto de poderem contribuir para a morbidade em certas situações, como, por exemplo, na administração de vetores replicantes em indivíduos imunodeprimidos e em indivíduos com pele atópica. Outra limitação dos vetores vivos é a imunidade anti-vetor, quer seja pré-existente e, portanto, presente antes da vacinação, quer seja conferida após a imunização inicial. Esta presença de anticorpos neutralizantes contra os vetores vai ter um impacto negativo sobre a vacinação, uma vez que vai atenuar a aceitação da vacina e a subsequente expressão dos antigénios virais, suprimindo ou diminuindo a imunogenicidade desejada provocada pelos vetores, devido à remoção do vetor, mesmo antes da transferência do DNA que codifica o antigénio para as células.<sup>13-16</sup>

Os vetores vivos mais estudados para o HIV são os vetores poxvírus (vírus incapazes de replicar em primatas) e adenovírus. Vetores de poxvírus incluem vaccinia, canarypox (ALVAC) e versões atenuadas de vaccinia, sendo estes últimos desenvolvidos devido aos riscos de segurança inerentes à administração de vetores vivos em indivíduos imunodeprimidos. Os vetores vivos atenuados sofrem pouca ou nenhuma replicação no hospedeiro devido à deleção de genes essenciais, limitando assim a aquisição de doença aquando da administração da vacina em indivíduos imunodeprimidos. É um exemplo destes vetores a vaccinia Ankara modificada (MVA). Vetores de vaccinia atenuados foram já testados em estudos de Fase I em seres humanos, no entanto, estes têm a desvantagem de serem menos imunogénicos que vetores vaccinia capazes de replicação, induzindo apenas baixos níveis de anticorpos neutralizantes, necessitando de um aumento considerável da dose, ou seja, do número de vetores na vacina, para ter tanto efeito como os vetores capazes de replicação.<sup>7, 13, 14, 16</sup>

Os vetores vivos têm sido bem caracterizados e contêm grandes quantidades de genoma de DNA, onde múltiplos genes podem ser inseridos. Já foram feitas várias construções estáveis contendo combinações dos genes *Env*, *Gag*, *Pol* e reguladores. Têm sido observadas relativamente fracas respostas de anticorpos humorais, no entanto as respostas de linfócitos T CD8 foram observadas em 35% a 65% dos indivíduos ao longo da duração do estudo, sendo esta a principal resposta induzida com este tipo de vacinas. Os vetores que expressam vários antigénios de HIV induziram uma maior resposta imune celular que aqueles que apenas expressam um antigénio, pois as vacinas que contêm apenas um antigénio são mais facilmente superadas pelas espécies mutantes. Estes linfócitos induzidos pelo vetor vivo recombinante foram capazes de lisar células infetadas com o vírus.<sup>13, 14, 16</sup>

O desenvolvimento de adenovírus como vetores vivos recombinantes tem tido bastante ênfase, sendo a construção mais extensivamente estudada a do vetor adenovírus 5 recombinante (Ad5r). Vetores de Ad5r que expressam antígenos de HIV foram avaliados em relação à imunogenicidade e em relação à eficácia em seres humanos, tendo demonstrado respostas imunitárias celulares de boa amplitude, em particular no que diz respeito à indução das células T CD8, conseguindo proporcionar um controle eficaz da replicação viral e proteção contra a progressão da doença induzida pelo vírus.<sup>15</sup> No entanto, uma das grandes limitações destes vetores é a elevada prevalência de imunidade pré-existente anti-Ad5 na população em geral (taxas de 30% a 40% em países desenvolvidos e 80% a 90% em países em desenvolvimento). Esta limitação está a tentar ser ultrapassada pelo desenvolvimento de vetores de adenovírus de serotipos raros como Ad26, Ad35 e Ad48, que são menos comuns na população humana e portanto há uma menor seroprevalência de anticorpos neutralizantes. Porém, os diferentes tipos de adenovírus são biologicamente diferentes em termos de utilização de recetores celulares, tropismo in vivo e eficácia protetora em estudos com primatas não humanos.<sup>13, 14, 15</sup>

Recentemente, um regime de vacina Ad26r com MVAr expressando os genes *Env*, *Gag* e *Pol* demonstrou proporcionar uma proteção parcial contra a aquisição da infeção, bem como a redução de cargas virais em macacos.<sup>13</sup>

#### **4.6 Vacinas de péptidos sintéticos**

A geração de péptidos sintéticos tem como vantagem incluir apenas epítomos de interesse imunológico que proporcionam uma resposta protetora, excluindo assim os epítomos de menor interesse. Porém, uma potencial desvantagem desta abordagem é a de que os péptidos sintéticos não podem estimular respostas imunes de epítomos que dependem da conformação. Para além disso, estes péptidos sintéticos provaram ser menos imunogénicos que as proteínas nativas, quer administrados por via intramuscular, quer por via oral ou retal, embora seja possível ultrapassar esta limitação através do acoplamento dos péptidos a proteínas transportadoras ou lípidos ou, ainda, através da adição de adjuvantes mais potentes.<sup>13</sup>

As combinações de péptidos formando um multi-epítomo, proteínas de fusão ou lipoproteínas longas estão numa fase de desenvolvimento inicial clínico, quer usadas isoladamente, quer usadas em regimes “prime-boost” com vetores vivos recombinantes.



Algumas têm tido a capacidade de induzir respostas imunes celulares, sendo por isso testadas como vacinas terapêuticas.<sup>14</sup>

Um exemplo deste tipo de vacinas consiste em péptidos de proteínas do envelope do HIV ligados a um esqueleto de oligo-lisina. Outro exemplo é um péptido linear híbrido que consiste em múltiplos epítomos capazes de serem reconhecidos pelos linfócitos T e B.<sup>13</sup>

#### **4.7 Vacinas das mucosas**

A mucosa oral, rectal e genito-urinária é o local de entrada do HIV na maioria das infeções. Após a entrada do HIV, ele é rapidamente disseminado por todo o corpo. Portanto, há um grande interesse para o desenvolvimento de vacinas que tenham como principal alvo as mucosas, impedindo a entrada do vírus e/ou o estabelecimento e disseminação da infeção. Assim sendo, a indução de respostas imunes nas mucosas, e portanto, no local de entrada do HIV, é um dos requisitos mais importantes de uma vacina contra o HIV. Este tipo de vacinas, para além de induzir respostas nas mucosas, induz também respostas sistémicas, obtendo assim uma resposta global ideal.<sup>14, 16, 17</sup>

No entanto, nem todas as vias de administração da vacina resultam na mesma resposta, quer em qualidade, quer em quantidade de resposta imunitária específica para o antigénio, sendo esta última altamente dependente da via exata de vacinação. A administração oral induz respostas imunes no trato gastrointestinal e nas glândulas mamárias, assim como respostas sistémicas. Já a administração nasal induz fortes respostas de anticorpos específicos para o antigénio nas glândulas salivares, trato respiratório, genital e retal, bem como sistemicamente. Concluindo e tendo em conta que a maioria das pessoas são infetadas pela via genital, a vacinação nasal é a melhor opção a considerar para uma vacina da mucosa contra o HIV.<sup>17</sup>

Uma vacina candidata baseada na gp41 foi produzida pela inserção de gp41r trimérica e gp41 dentro de um virossoma (lipossoma com as glicoproteínas hemaglutinina e neuraminidase do vírus influenza). A vacina foi administrada pela via intramuscular em modelos animais, seguida de uma administração intranasal, o que resultou no bloqueio da transcitose, impedindo a aquisição da infeção e/ou infeção prolongada.<sup>14, 16</sup>

#### **4.8 Vacinas de regime “Prime-Boost”**

Vacinas “Prime-Boost” foram desenvolvidas para casos em que a resposta imunitária numa única dose de vacina é insuficiente para proporcionar uma proteção eficaz, sendo o mesmo antigénio administrado duas vezes por vias diferentes sucessivas. A intenção de um regime de combinação é induzir diferentes tipos de resposta imunitária e aumentar a resposta imune em geral, um resultado que pode não ocorrer se apenas um tipo de vacina estiver a ser administrada. A primeira administração do antigénio atua como o “prime” provocando uma resposta imune, já a segunda administração atua como “boost”, ou seja, como um reforço devido à reexposição do antigénio.

Esta abordagem “Prime-Boost” tem sido extensamente desenvolvida e estudada em ensaios clínicos, pois parece ser o meio mais eficaz de induzir boas respostas de linfócitos T.

17

##### **4.8.1 Vacinas “Prime-Boost” de DNA e vetor vivo recombinante**

Vários estudos demonstram que a imunogenicidade de vacinas de vetores vivos foi significativamente melhorada quando administrada como um reforço após a imunização inicial de uma vacina de DNA. Como exemplo temos o “Prime-Boost” de DNA-Ad5 que teve uma resposta imune com uma magnitude sete vezes maior, quando comparada com a vacina de Ad5r por si só. Houve uma maior indução de células T de memória e efetoras, bem como uma maior produção de anticorpos neutralizantes, permitindo um melhor controlo das cargas virais. Esta sinergia entre o DNA e vetores vivos recombinantes foi observada em vários estudos com primatas não humanos, mostrando ser uma abordagem mais eficaz para a indução de respostas imunitárias de células T. Com estas vacinas consegue-se um controlo da carga viral por longos períodos de tempo, bem como a preservação dos linfócitos T CD4. Outros exemplos deste tipo de “Prime-Boost” são vacinas de DNA-MVA e vacinas de DNA-vaccinia.<sup>14, 16</sup>

##### **4.8.2 Vacinas “Prime-Boost” de dois vetores vivos recombinantes**

Outro tipo de regime de vacinação “Prime-Boost” foi desenvolvido usando dois vetores vivos recombinantes diferentes, expressando o mesmo antigénio, tal como vetores Ad5 seguidos por um vetor de poxvírus, ou, então, dois vetores de adenovírus sucessivos (Ad11-Ad35) ou, ainda, dois vetores de poxvírus. Respostas imunes obtidas com estes regimes de vacinação foram significativamente maiores do que as induzidas por regimes com vetores individuais, havendo uma maior diminuição da carga viral e da mortalidade associada à SIDA,

devido à maior indução de linfócitos T e de anticorpos neutralizantes.<sup>14, 16</sup> A vacina “Prime-Boost” de Ad26r seguida de MVA, expressando, ambos, os genes *Gag*, *Pol* e *Env* é um exemplo deste subgrupo de vacinas.<sup>16, 24</sup>

#### **4.8.3 Vacinas “Prime-Boost” de vetor vivo recombinante e proteína**

Uma nova estratégia de “Prime-Boost” foi desenvolvida usando uma combinação de um vetor de vírus vivo como “Prime” seguido por uma vacina de uma subunidade proteica como “Boost”, tendo como objetivo estimular ambas as respostas imunes humoral e celular. Como exemplo temos a vacina constituída por um vetor vivo de canarypox seguido pela gp120, que teve um grande impacto no desenvolvimento das vacinas contra o HIV, uma vez que os estudos desenvolvidos com esta vacina (RV-144) foram, até hoje, os únicos a ter sucesso na prevenção da aquisição da infecção, não tendo, no entanto, diminuindo a carga viral nos indivíduos que apesar da administração da vacina foram infetados, e por isso não apresentou impacto na progressão da doença.<sup>14, 16, 19</sup> Apesar dos resultados terem sido reveladores, não foram completamente satisfatórios, visto que poucos voluntários desenvolveram anticorpos neutralizantes, apenas 24% apresentou respostas dos linfócitos T CD8 e somente dois terços dos voluntários apresentou respostas detetáveis de linfócitos T CD4 contra a proteína Env após seis meses de vacinação. Tendo em conta este panorama, novos ensaios clínicos estão a ser planeados, tendo por base todos os resultados conseguidos no ensaio RV-144, como por exemplo, o efeito da administração de um reforço extra da gp120r.<sup>16</sup>

#### **4.8.4 Vacinas “Prime-Boost” de DNA e proteína**

Um outro tipo de Vacina “Prime-Boost” combina a presença de uma vacina de DNA com uma vacina de subunidade constituída por uma proteína do envelope, proporcionando uma maior proteção comparando com as vacinas sozinhas. Uma mistura de plasmídeos com DNA que codifica a proteína Env foi administrada como a primeira imunização, sendo seguida de uma mistura de proteínas gp120 de diferentes subtipos de HIV, estimulando assim uma resposta de anticorpos diversificada, com elevada avidéz de anticorpos e atividade neutralizante contra diferentes estirpes do HIV.<sup>14, 16</sup>

## 5. RESUMO E PERSPETIVAS FUTURAS

Até à data, e apesar dos mais de 25 anos de investigação, ainda não há uma vacina contra o HIV que tenha sido bem sucedida e provavelmente não haverá num futuro próximo. Em grande parte, isto deve-se ao facto de não se saber quais os componentes imunes específicos necessários e suficientes para a proteção contra o HIV, nem se saber qual a melhor maneira de obter determinadas respostas imunes que levariam, provavelmente, à proteção.<sup>16</sup> Os primeiros avanços no desenvolvimento de vacinas contra o HIV foram destinados a induzir anticorpos neutralizantes, no entanto, foram encontradas dificuldades com o antigénio a escolher, tendo o foco da investigação invertido para as respostas dos linfócitos T CD8, o que parecia ser uma abordagem lógica. O objetivo era induzir uma população de linfócitos T CD8 de memória de longa duração, capazes de matar células infetadas em exposições secundárias ao vírus. Porém, em vez disso, os resultados dos ensaios foram decepcionantes gerando novas dúvidas sobre a estratégia a ser utilizada. Hoje em dia, uma abordagem combinada com a indução de anticorpos neutralizantes e respostas celulares eficientes capazes de eliminar células infetadas parece ser a opção mais viável, no entanto, difícil de conseguir com apenas uma simples vacinação.<sup>22</sup>

O campo das vacinas contra o HIV está a passar agora por um renascimento devido aos inúmeros avanços recentes. A demonstração da eficácia e segurança da vacina pela primeira vez no ensaio clínico RV-144 levou a programas de investigação clínica, tendo como principal foco a proteção contra a infeção. Para além disso, um número elevado de novas vacinas candidatas entraram recentemente em ensaios clínicos, em estudos pré-clínicos, tendo um melhor desempenho que os candidatos já existentes, no que diz respeito ao controlo da infeção e, em alguns casos, relativamente à prevenção da aquisição da infeção. Concluindo, os novos candidatos são cada vez mais promissores, sendo por isso mesmo priorizados em detrimento dos já existentes, tendo sempre como objetivo final a progressão para o sucesso.

Vacinas de mucosas parece ser uma ideia promissora visto que as superfícies mucosas, tais como a vaginal e a rectal, são os principais locais de entrada do HIV. Imunização das mucosas, para além de fornecer imunidade da mucosa, fornece também imunidade sistémica, o que é uma mais-valia para uma vacina.<sup>15</sup>

Relativamente às perspectivas futuras no desenvolvimento de vacinas contra o HIV, todos os esforços têm sido feitos para alcançar o objetivo de desenvolver candidatos a vacinas capazes de induzir anticorpos amplamente neutralizantes evitando assim a infeção pelo HIV, bem como respostas imunes celulares robustas que consigam controlar a infeção por HIV.

Assim, a identificação de anticorpos monoclonais amplamente neutralizantes tem levado à identificação de novos alvos para a concepção de uma vacina, sendo o principal objetivo, induzir a produção dos tais anticorpos amplamente neutralizantes. Como o progresso gradual neste campo continua, será de esperar o surgimento de novas vacinas candidatas substancialmente mais imunogénicas.<sup>1, 6, 14</sup>

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KOFF, W. C. *et al.* - **Accelerating the development of a safe and effective HIV vaccine: HIV vaccine case study for the decade of vaccines.** *Vaccine* 31, 2013.
2. KOFF, W. C. - **HIV vaccine development: Challenges and opportunities towards solving the HIV vaccine-neutralizing antibody problem.** *Vaccine* 30. 2012. p.4310–4315.
3. HAYNES, B. F. *et al.* - **Progress in HIV-1 vaccine development.** *J. Allergy Clin. Immunol.* 134, 2014, p.3–10.
4. PALESCH, D. ; KIRCHHOFF, F. - **First steps toward a globally effective HIV/AIDS vaccine.** *Cell* 155, 2013. p.495–497.
5. MCKINNON, L. R. ; CARD, C. M. - **HIV vaccine efficacy trials: A brief history, and options for going forward.** *AIDS Rev.* 2010. p.209–217.
6. THORNER A.R.; BAROUCH D. H. - **Therapeutic vaccines.** *J. Med. Microbiol.* 45. p. 81–83.
7. JEROME, H. K.; NELSON L. M. - **The design of a global HIV vaccine.** *Sande's HIV/AIDS Medicine.*
8. FAUCI, A. S.; FOLKERS, G. K. ; MARSTON, H. D. - **Ending the Global HIV/AIDS Pandemic: The Critical Role of an HIV Vaccine.** *Clin. Infect. Dis.* 59 Suppl 2. 2014.
9. MUNIER, C. M. L.; ANDERSEN, C. R.; KELLEHER, A. D. - **HIV Vaccines Progress to Date.** 2011. p.387–414.
10. LAKHASHE, S. K.; SILVESTRI, G.; RUPRECHT, R. M. - **No Acquisition: a New Ambition for HIV Vaccine Development?** *Natl. Institutes Heal.* 29. 2011.
11. BAROUCH D. H.; DEEKS S. G. - **Immunologic Strategies for HIV-1 Remission and Eradication.** *Natl. Institutes Heal.* 29. 2014.
12. PICKER L. J.; SCOTT G. H.; LIFSON J. D. - **New Paradigms for HIV/AIDS Vaccine Development.** *Natl. Institutes Heal.* 29. 2012.
13. BAROUCH, D. H.; BADEN, L. R.; DOLIN, R. 132 - **Vaccines for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection.** *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.*

14. GIRARD M.P.; KOFF W.C. - **Human immunodeficiency virus vaccines.** *Advances in virus research* 42.
15. CHHATBAR, C.; MISHRA, R.; KUMAR, A.; SINGH, S. K. - **HIV vaccine: Hopes and hurdles.** *Drug Discov. Today* 16. 2011. p.948–956.
16. GIRARD, M. P.; OSMANOV, S.; ASSOSSOU, O. M.; KIENY, M.-P. - **Human immunodeficiency virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: A review.** *Vaccine* 29. 2011. p.6191–6218.
17. PETERS, B. S. - **HIV vaccines: past failures and future scientific challenges.** *Infectious Diseases. Chapter 87*
18. **Toward an effective AIDS vaccine development.** *Immunity, C. News & EFIS.* 2013. p.3087–3089.
19. GOEPFERT, P.; BANSAL, A. - **Human Immunodeficiency Virus Vaccines.** *Infect. Dis. Clin. North Am.* 28. 2014.
20. DAY T. A.; KUBLIN J. G. - **Lessons Learned from HIV Vaccine Clinical Efficacy Trials.** *Natl. Institutes Heal.* 2013.
21. COLMAN, E. *et al.* - **New england journal.** 2014.
22. LEMA, D.; SANCTIS, J. B. - **HIV vaccines: A brief overview.** *Scand. J. Immunol.* 80. 2014.
23. PASSAES, C. P.; SÁEZ-CIRIÓN, A. - **HIV cure research: Advances and prospects.** *Virology.* 2014. p.340–352.
24. BAROUCH, D. H.; MICHAEL, N. L. - **Accelerating HIV-1 Vaccine Efficacy Trials.** *Cell* 159, 2014, p.969–972.