

Novas Estratégias de Vacinas

New Strategies in Vaccines

Jorge Kalil, Edecio Cunha-Neto, Luiza Guilherme

Instituto do Coração (InCor) e Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Instituto do Milênio; São Paulo, SP, Brasil

Modelos Atuais de Desenvolvimento de Vacinas

A partir da primeira vacinação feita por Jenner que gerou a produção de anticorpos contra o vírus da varíola, vinculou-se a capacidade de proteção após a imunização com diferentes patógenos (vírus e bactérias) à produção de anticorpos. Com os novos conhecimentos da imunologia, uma vacina para ser eficiente precisa ativar linfócitos T auxiliares que por sua vez ativam linfócitos B a produzir anticorpos específicos, bem como produzir células citotóxicas potentes. As células T auxiliares também geram inúmeras células de memória que rapidamente são mobilizadas quando ocorre a penetração de um agente infeccioso no organismo. Os conhecimentos atuais sobre as interações celulares que ocorrem para o desencadeamento da resposta imune, nos permitem analisar os fatores relevantes envolvidos no reconhecimento do antígeno pelos linfócitos T, portanto, a escolha do antígeno para a confecção de uma vacina é fundamental.

Dentre as novas abordagens, temos vacinas confeccionadas a partir de seqüências de aminoácidos de proteínas que são sintetizadas em laboratório (vacinas de peptídeos sintéticos); vacinas com proteínas recombinantes e vacinas de DNA.

Nos três modelos de vacinação citados (proteína recombinante, na baseada em peptídeos sintéticos ou DNA), a escolha dos epítomos é fundamental. É necessário que os peptídeos sejam naturalmente apresentados ao linfócito T durante a infecção; que sejam reconhecidos por praticamente 100% dos indivíduos e que induzam resposta imune adequada. O principal evento no desencadeamento da resposta imune é o reconhecimento do antígeno pelo receptor ab do linfócito T ligado às moléculas HLA de classe I ou II. Atualmente, existem programas computadorizados baseados em algoritmos que indicam a capacidade de ligação de determinados peptídeos a determinadas moléculas HLA, permitindo a escolha de segmentos com maiores chances de serem reconhecidos pela maioria dos indivíduos, no caso de escolha para uma vacina (CUNHA-NETO, 1999).

Recebido em 20/12/2007

Aceito em 25/01/2008

Endereço para correspondência: Dr. Jorge Kalil. Laboratório de Imunologia, Instituto do Coração, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44, 9º andar, Bloco 2. 05403-903. São Paulo, SP, Brasil.

Gazeta Médica da Bahia

2008;78 (Suplemento 1):65-71.

© 2008 Gazeta Médica da Bahia. Todos os direitos reservados.

Vacina com Proteínas Recombinantes

A partir da identificação de proteínas imunogênicas de um determinado agente microbiano é possível identificar as seqüências de nucleotídeos que compõem estas proteínas em um banco de dados e produzir grandes quantidades destas proteínas, usando-se a metodologia denominada de DNA recombinante. Resumidamente, segmentos de genes que codificam determinadas seqüências são acoplados em vetores específicos que posteriormente são inseridos em bactérias, geralmente *E. coli*, em leveduras ou em células de mamíferos. As bactérias ou leveduras recombinantes são posteriormente selecionadas de forma específica e o crescimento é feito em larga escala, geralmente em fermentadores. Uma vez obtida grande quantidade de bactérias ou leveduras, estas são submetidas à lise celular liberando a proteína recombinante produzida, para posterior purificação por métodos bioquímicos. Um exemplo de vacina recombinante é a vacina contra a hepatite B produzida em leveduras, através da clonagem do gene do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) e que induz a formação de anticorpos protetores contra o vírus da hepatite B.

Pelo método de vacina recombinante também é possível introduzir apenas seqüências gênicas de proteínas imunodominantes de determinados patógenos em vetores bacterianos ou virais atenuados, que serão inoculados e que irão replicar-se no organismo. Os vetores atenuados mais utilizados são o vírus da vaccínia, poliovírus, cepas atenuadas de *Salmonella*, cepas de BCG do *Mycobacterium bovis*, entre outros.

Vacina com Peptídeos Sintéticos

Baseia-se na seleção de epítomos imunodominantes contendo aproximadamente 15 resíduos de aminoácidos. A vantagem deste modelo é a possibilidade de testar pequenas alterações de seqüência, i.e., pode-se substituir ou eliminar 01 a 02 resíduos de aminoácidos. Estas alterações permitem verificar a capacidade de resposta pelos linfócitos T e B dos novos epítomos assim como a capacidade de ligação às moléculas HLA para posterior apresentação ao linfócito T, e desencadeamento da resposta imune.

A síntese de peptídeos imunogênicos tem grande potencial para o desenvolvimento de vacinas.

Vacina de DNA

Insera-se o DNA que codifica uma determinada proteína em um plasmídeo contendo a região promotora que irá permitir a transcrição do gene introduzido em células de mamíferos que após ser inoculado, desencadeia uma resposta ativa de linfócitos T e B. Aparentemente, algumas células apresentadoras de antígenos (monócitos e/ou células dendríticas) são transfectadas com estes plasmídeos contendo os epítomos imunogênicos e são capazes de desencadear resposta imune específica. A grande vantagem, deste modelo é a possibilidade de promover a resposta de células T citotóxicas (CTLs) na ausência de germes vivos atenuados e, desta forma, tornar-se uma vacina potente.

É estável, com baixo custo de produção e possibilidade de se usar o mesmo vetor para diversos antígenos. As vacinas gênicas são normalmente inoculadas por via intramuscular ou usando o processo de biobalística que utiliza uma arma gênica “gene gun” que promove a aceleração e introdução de micropartículas de ouro encobertas com o DNA de interesse na derme. O processo da biobalística necessita apenas de pequenas quantidades de DNA (<1µg) em relação à injeção intramuscular que necessita de aproximadamente 100µg. Outro aspecto a ser considerado é o tipo de resposta imune preferencialmente desencadeada, decorrente da via de inoculação. Aparentemente, a via intramuscular induz preferencialmente padrão Th1 e a biobalística induz preferencialmente Th2 (OLIVEIRA, 1999).

Recentemente, uma vacina de DNA foi utilizada com sucesso por grupo brasileiro, da FMUSP/RP, para proteger e mesmo tratar infecção instalada por *Mycobacterium tuberculosis* resistente a tratamento em camundongos (LOWRIE, 1999).

Essas novas metodologias podem usar adjuvantes (extratos de bactérias, hidróxido de alumínio e lipídeos) em vacinas com peptídeos sintéticos e imunomoduladores como citocinas e moléculas co-estimuladoras em vacinas de DNA.

O uso de substâncias adjuvantes ou imunomoduladores pode aumentar a resposta imune. Os adjuvantes induzem inflamação local e aumentam a expressão de moléculas co-estimuladoras e produção de citocinas, principalmente a IL-12 que estimula o crescimento e a diferenciação dos linfócitos T. Bactérias mortas pelo calor são potentes adjuvantes e são normalmente usadas para imunização em modelos experimentais. Devido ao forte efeito inflamatório, estas substâncias não são usadas em humanos. Alguns adjuvantes de efeito inflamatório mais leve estão sendo usados em humanos, como gel de hidróxido de alumínio (liga proteínas de forma não covalente e, portanto, induz uma leve inflamação); substâncias lipídicas que serão ingeridas por fagócitos. Também existe a possibilidade de se injetar substâncias que ativem linfócitos T, como a IL-12. Em vacinas usando DNA recombinante ou plasmídeos é possível incorporar genes de substâncias co-estimuladoras (moléculas B7 e CD40) ou genes de citocinas, p. ex. IL-12.

Graças às novas abordagens propostas, inúmeros ensaios de vacinas vêm sendo realizados no mundo contra vírus, parasitas e bactérias. A maioria encontra-se em fase de pesquisas básica ou pré-clínica, conforme relatado no Jordan Report 2002 - *National Institutes of Health* (NIH) (JORDAN REPORT, 2002). Apesar de já existirem vacinas comercializadas e em uso para vários microrganismos, novos modelos de vacinas vêm sendo usados, p.ex. contra *Bordetella pertussis* tais como a vacina com toxinas B. pertussi (PT) purificadas e acelulares, vacina PT recombinante e peptídeos PT conjugados; vacina contra *H. influenzae* envolvendo vacinas recombinantes de proteínas ou subunidades de proteínas bacterianas. No que diz respeito às vacinas anti-vírus os testes de vacinas com proteínas virais recombinantes, vacinas de peptídeos e vacina de DNA vêm sendo extensivamente analisados. Um exemplo é a tentativa de se produzir vacina eficaz e segura contra o HIV. Já são descritos inúmeros tipos de vacinas usando subunidades do vírus HIV; ou ensaios de vacina baseados em peptídeos de proteínas virais (vacina de peptídeos sintéticos ou recombinantes); ensaios de partículas virais, principalmente na forma de vacina recombinante, usando sequências de DNA de proteínas virais (vacina de DNA). A maioria destes estudos encontra-se em fase pré-clínica, com ensaios em pequenos animais. Alguns já em ensaios de fase clínica I e como tratamento e prevenção da doença e outros modelos em fase II e III.

Estes exemplos nos mostram a importância e a diversidade de abordagens para confecção de vacinas à luz dos conhecimentos atuais, visando a produção de vacinas eficazes e seguras contra diversos patógenos.

Estudos de Nosso Grupo para Obtenção de Vacina contra HIV

Situação Atual

A infecção pelo HIV é a grande epidemia emergente de nosso século. A obtenção de uma vacina eficaz contra o HIV é um objetivo global e uma contribuição fundamental para o bem-estar das partes economicamente menos favorecidas do mundo. Dentre os desafios para o desenvolvimento dessa vacina, um dos maiores é a grande diversidade do HIV-1. A experimentação em primatas não-humanos mostrou que, embora a imunização com vírus inativado fosse capaz de gerar anticorpos neutralizantes e proteger contra o desafio com o vírus HIV ou SHIV homólogo, essa proteção era altamente restrita, não ocorrendo contra variantes próximos ou outros isolados (BABA *et al.*, 2000; MASCOLA *et al.*, 2000). Até hoje, tem sido muito difícil induzir a produção de anticorpos de amplo espectro neutralizante (revisto por LETVIN, 2005). Por isso, muitas das vacinas experimentais correntemente em testes têm como princípio o estímulo da imunidade celular. Embora várias vacinas experimentais que induzem a imunidade celular tenham-se mostrado imunogênicas em ensaios clínicos de fase I, a grande maioria não mostrou qualquer proteção em

ensaios de vacinação profilática (p. ex. ensaio IIB vacina Merck, interrompido em 2007), ou controle de viremia, no caso das vacinas terapêuticas (KINLOCH-DE-LOES *et al.*, 2005).

Importância da Identificação de Epítomos Vacinais Reconhecidos por Linfócitos T CD4+

Embora sejam os linfócitos T CD8+ (citotóxicos) anti-HIV-1 os que efetivamente destroem células infectadas pelo vírus, sua atividade é fundamentalmente dependente da presença de células T CD4+ anti-HIV-1 (ROSENBERG *et al.*, 1997; KALAMS *et al.*, 1998; HEENEY *et al.*, 2002). Recentemente, foi observado que vacinação preserva as células T CD4+ de memória de primatas desafiados com SIV (MATTAPALLIL *et al.*, 2006), e que isto leva a uma sobrevida aumentada (LETVIN *et al.*, 2006). Dessa forma, a inclusão de epítomos apropriados do HIV-1 reconhecidos pela célula T CD4+ pode ser uma parte essencial para o sucesso de uma candidata a vacina anti-HIV-1. Entretanto, há poucos epítomos para linfócitos T CD4+ do HIV-1 já conhecidos, em comparação aos epítomos CD8+, muito mais estudados. Isto pode ser comprovado por exemplo, pelo número de trabalhos descrevendo epítomos na proteína p17 *gag* do HIV-1 (22 para linfócitos CTL/CD8+ *versus* 5 para linfócitos helper/CD4+), relatadas até 2003 na base de dados de seqüências do HIV-1 de Los Alamos, <http://HIV-1-web.lanl.gov>). Assim, existe uma importante necessidade de identificação de epítomos e elucidação de respostas de células T CD4+ anti-HIV-1, que pode melhorar a eficácia de novos imunógenos anti-HIV-1.

Resultados Anteriores do Grupo: Identificação de Epítomos Novos Imunodominantes do HIV-1

É possível que as dificuldades enfrentadas pelas vacinas experimentais testadas até hoje sejam em parte derivadas do desenho de suas seqüências. Praticamente todas as vacinas experimentais testadas foram baseadas em proteínas ou genes inteiros do HIV-1. Vacinas de DNA, recombinantes ou de vetores virais que codificam genes ou proteínas inteiras do HIV-1 permitem a reprodução dos mecanismos de escape molecular desenvolvidos pelo HIV-1 nativo, em resposta às pressões imune e outras, o que pode ser responsável pela ausência de proteção conferida por tais vacinas. Uma vacina putativa baseada em epítomos – apresentados fora do contexto das seqüências flanqueadoras das proteínas nativas – poderia abortar os mecanismos de escape do processamento, apresentação e reconhecimento imunológicos, levando à indução de respostas imunes celulares amplificadas. Outro aspecto essencial é que tais epítomos devem ser reconhecidos pela totalidade – ou a maioria – dos indivíduos, e a sua identificação é altamente prioritária, de forma a cobrir uma proporção significativa da população exposta. É possível que esta estratégia, junto com novas estratégias para formulação de imunógenos, possa gerar uma vacina protetora.

A identificação e análise de epítomos de linfócitos T e B tem sido um dos principais focos de nosso grupo de pesquisa nos últimos anos, com ênfase para a identificação de epítomos de linfócitos T CD4+ (RIZZO *et al.*, 1989; CUNHA-NETO *et al.*, 1994,1995, 1996; ABEL *et al.*, 1997; ABEL *et al.*, 2005; DURANTI *et al.*, 1999; IWAI *et al.*, 2001; IWAI *et al.*, 2005; FONSECA *et al.*, 2005).

Em estudos anteriores, estabelecemos como meta identificar epítomos imunodominantes novos, não previamente conhecidos, do HIV-1 reconhecidos por linfócitos T CD4+, para um possível uso vacinal. Nossa estratégia foi de 1) a identificação de epítomos vacinais é importante para a construção de uma vacina – já que podem ser usados fora do contexto da seqüência flanqueadora na proteína nativa, o que evitaria o escape evolutivo do reconhecimento dos epítomos, por processamento alternativo; 2) a seleção de múltiplos epítomos aumenta as chances de cobertura vacinal na população; 3) a identificação de epítomos de linfócitos T CD4+ capazes de se ligarem a múltiplas moléculas HLA-DR (que apresentam epítomos para linfócitos T CD4+) distintas, presentes na grande maioria da população, aumentando as chances de cobertura na população geneticamente heterogênea; 4) a seleção de regiões mais conservadas no HIV aumentaria a abrangência da proteção mesmo quanto a isolados virais mais distantes. Com tais premissas, utilizamos o algoritmo TEPITOPE (STURNIOLO *et al.*, 1999; www.vaccinome.com) para varrer as regiões conservadas do genoma completo do HIV-1 (subtipo B), e selecionar seqüências das proteínas do HIV-1 que poderiam se ligar a múltiplas moléculas HLA-DR comuns na população geral. Essa estratégia tem possibilitado ao nosso grupo selecionar epítomos freqüentemente reconhecidos pelos linfócitos T CD4+ nas proteínas imunodominantes obtidas de vários patógenos e alvos de doenças auto-imunes (IWAI *et al.*, 2003; FONSECA *et al.*, 2004; DAMICO *et al.*, 2005; ABEL *et al.*, 2005; FONSECA *et al.*, 2006). Foram selecionados 18 epítomos, dos quais 11 ainda não descritos, com a propriedade de se ligarem promiscuamente a pelo menos dois terços das 25 moléculas HLA-DR descritas pelo algoritmo TEPITOPE. A capacidade dos epítomos identificados de se ligarem a múltiplas moléculas HLA-DR, representando empiricamente a variedade dessas moléculas na população, foi confirmada por ensaios de ligação HLA-peptídeo. A análise com ensaio de ELISPOT-IFN-gama mostrou que todos os 18 peptídeos selecionados foram reconhecidos por células mononucleares de pelo menos 18% dos pacientes em diferentes estágios da infecção por HIV (de progressores lentos com CD4+ >500 sem antiretrovirais até progressores rápidos com CD4+ <200 com antiretrovirais). Significativamente, 91% (29/32) dos pacientes reconheceram pelo menos um dos 18 peptídeos (FONSECA *et al.*, 2006), reconhecendo em média 5 peptídeos distintos. Os dados indicam que os peptídeos testados são freqüentemente reconhecidos em populações de pacientes HIV+ não selecionadas, o que indica que são naturalmente apresentados durante a infecção pelo HIV-1 (FONSECA *et al.*, 2006). Pela

característica poliepitópica e polialélica das seqüências de consenso do HIV-1 do subtipo B selecionadas pelo nosso grupo (FONSECA *et al.*, 2006), serem frequentemente reconhecidas por células T CD4+, é esperado que esses epítomos possam produzir uma resposta com significante amplitude e cobertura sobre a disparidade HLA das populações altamente heterogêneas, e talvez permitir uma imunização cruzada entre os clados, já que as seqüências são altamente conservadas entre subtipos distintos (FONSECA *et al.*, 2006).

Com o objetivo de avaliar efetivamente a imunogenicidade dos epítomos, construímos vacina de DNA contendo plasmídeo pVAX-1 codificando *in tandem* os epítomos imunodominantes de seqüências conservadas do HIV-1 frequentemente reconhecidas por pacientes HIV-1+ descritos anteriormente (Figura 1). Imunizamos camundongos Balb/c e avaliamos a frequência de células produtoras de IFN-gama e proliferativas (ensaio de diluição de CFSE). Nossos resultados preliminares apontam para a imunogenicidade da vacina de DNA, elicitando números significativos de linfócitos T CD4+ e CD8+, indicando o sucesso da abordagem poliepitópica e polialélica. Experimentos pré-clínicos utilizando camundongos “humanizados” (transgênicos para moléculas HLA de classe II, TANEJA *et al.* 2003) poderão demonstrar o perfil de resposta imune humana antes de ensaios clínicos com voluntários saudáveis ou pacientes. Estudos com primatas não-humanos, e ensaios clínicos com a vacina já estão em planejamento.

Estudo do Nosso Grupo para Obtenção de Vacina contra o Estreptococo do Grupo A

Infecções por *S. pyogenes* ou estreptococo beta hemolítico do grupo A causam faringites ou infecções de pele. A incidência de faringites varia de acordo com as mudanças de estações, idade, condições sócio-econômicas, fatores ambientais e qualidade do tratamento. As principais seqüelas das faringites causadas pelo *S. pyogenes* são a febre reumática (FR) e suas complicações, doenças invasivas como fasciite necrotizante e outras.

Em países em desenvolvimento e ou subdesenvolvido grande número de indivíduos não tem acesso ao atendimento médico o que favorece o aparecimento principalmente da FR. Dados da organização Mundial da Saúde de 2004 registram 616 milhões de casos de faringite estreptocócica e aproximadamente 20 milhões de casos de FR no mundo. A doença reumática cardíaca (DRC), a mais grave seqüela da FR é ainda considerada um dos maiores problemas de saúde pública em países em desenvolvimento, sendo responsável por 233.000 mortes/ano. No Brasil, a FR e a DRC ainda são muito freqüentes principalmente em regiões onde acesso ao tratamento médico é mais difícil.

O desenvolvimento de uma vacina contra o estreptococo beta hemolítico, certamente acarretará na diminuição dos casos de faringite estreptocócica e conseqüentemente FR e de suas seqüelas, e outras doenças decorrente da estreptococcia.

O grande desafio, em produzir a vacina é não causar doença auto-imune. Neste sentido, há 20 anos trabalhamos para compreender mecanismos desencadeadores das reações auto-imunes. Vários trabalhos que realizamos permitiram identificar regiões da proteína M, principal proteína da bactéria, com potencial de desencadear doença e, também regiões protetoras. Todos os nossos estudos conjuntamente com dados de diversos pesquisadores corroboram para o desenvolvimento da vacina contra o estreptococo que atualmente encontra-se em fase experimental em camundongos em nosso laboratório. O artigo submetido envolve o desenho, a escolha e definição da região escolhida como agente vacinal.

Abordamos a confecção de vacina contra o estreptococo do grupo A, com base na escolha de peptídeos imunodominantes com caráter protetor. Concebemos dois modelos distintos para o desenvolvimento da vacina como segue:

Metodologia

1º) Vacina partindo da inoculação de peptídeos sintéticos – Analisamos a reatividade humoral por teste imunoenzimático de ELISA, inicialmente em 250 amostras de soros, selecionamos 38 peptídeos que apresentaram maior reatividade e aumentamos o número de amostras para 620 indivíduos (323 de indivíduos normais, 296 de pacientes com FR). O valor de corte (controle negativo) foi calculado pelo método do “Box plot” e pelo teste de Kruskal – Wallis.

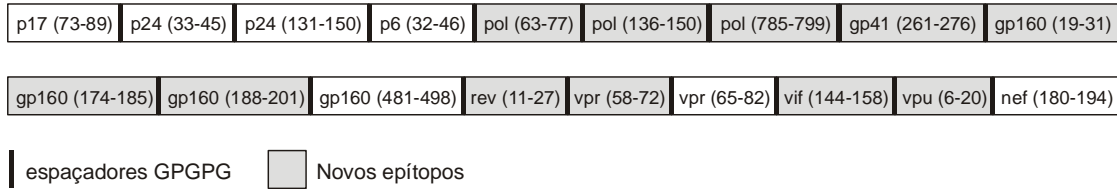
Analisamos também a resposta celular (linfócitos T) de 258 indivíduos (133 pacientes e 125 controles) por teste de proliferação celular, que consiste em estimular os linfócitos de sangue periférico com os peptídeos sintetizados por 96h seguido de incorporação de timidina triciada para contagem das células ativas em contador beta de irradiação.

Identificamos os antígenos HLA de classe II (HLA-DR) de 197 indivíduos testados para resposta celular, por metodologia de reação em cadeia com polimerase – PCR.

A partir da análise dos 38 peptídeos compartilhados localizados nos blocos C2, C3 e parte do bloco D, identificamos 25 resíduos de aminoácidos (SEASRKGLRRDLASREAKKQVEKA) reconhecidos por anticorpos presentes em mais de 80% dos soros dos indivíduos testados, que foi definido como epítipo B. Anticorpos reativos ao epítipo B foram capazes de inibir a adesão e invasão de 7 cepas testadas do *S. pyogenes* à célula HEp2, como segue: M5, M6, M44/61 e M87 > 95% de inibição da adesão e invasão celular e M1 90%, M71 e M22 70% de inibição da adesão e invasão celular. Paralelamente identificamos a região reconhecida por linfócitos T (epítipo T) composta por 22 resíduos de aminoácidos (KGLRRDLASREAKKQLEAEQQ). A comparação dos epítomos T e B mostrou o compartilhamento de 16 resíduos de aminoácidos (KGLRRDLASREAKKQ) (GUILHERME *et al.* 2006). A identificação das moléculas HLA de classe II mostrou que indivíduos que reconhecem os epítomos T e B são portadores de diversos HLA-DR.

Figura 1. Etapas para a construção de uma vacina de DNA contra o HIV-1 contendo múltiplos epítomos CD4+.

Construção de gene artificial com 18 epítomos do HIV-1 in tandem (spacers GPGPG, otimização de códons)



Subclonagem do gene artificial poliepotópico no vetor pVAX-1

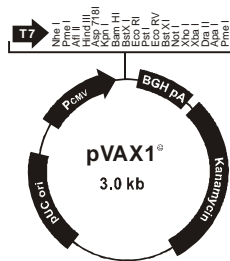


Figura 2. Vacina recombinante da porção C-terminal.

Epítomos T and B

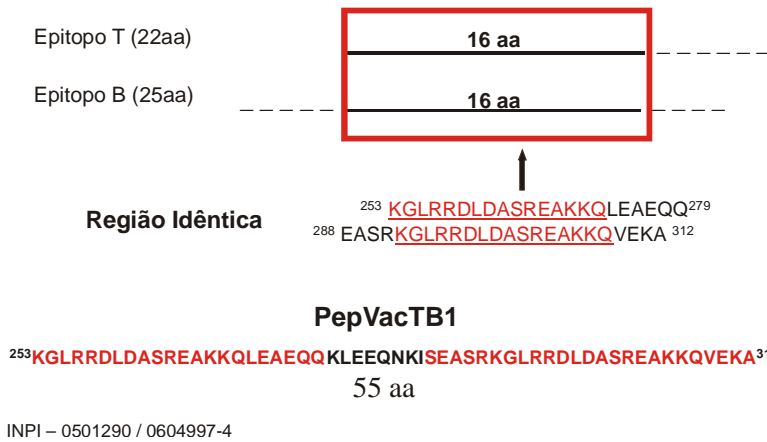


Figura 3. Epítomos T e B.

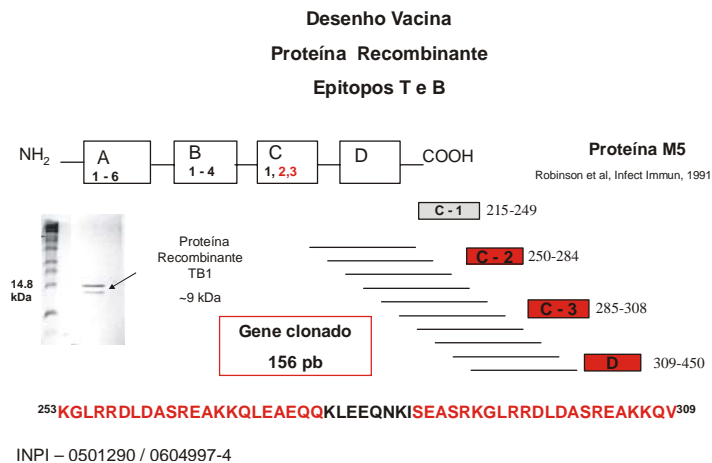
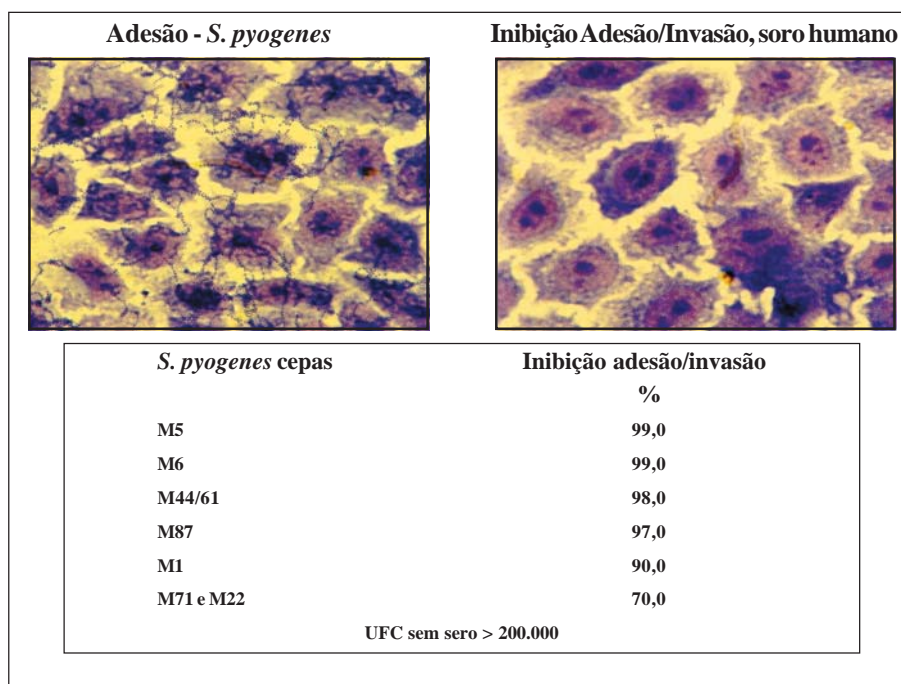


Figura 4. Soro humano reativo ao epítipo candidato a vacina inibe a adesão e invasão de várias cepas do estreptococo do grupo A, à célula HEp2 *in vitro*.



2º) Vacina recombinante da porção C-terminal – as seqüências gênicas correspondentes aos epítipos com caráter protetor, delineados a partir do modelo de vacina usando peptídeos sintéticos, foram inseridas em vetores de expressão para a proteína M (Figura 2).

A identificação dos epítipos T e B permitiu a construção do agente vacinal contendo os resíduos de aminoácidos dos dois epítipos ligados por 07 resíduos, constituído no total por 55 resíduos de aminoácidos em conformidade com a seqüência da proteína nativa: KGLRRDLASREAKKQLEAEQQKLEEQNKISEASRKGLRRDLASREAKKQVEK. Estas seqüências foram patenteadas (PI 0501290-2; PI0604997 e PCT/BR 2007/000184) (Figura 3).

Para o desencadeamento da resposta imune é necessária a participação de três moléculas: as moléculas HLA na superfície de células apresentadoras de antígenos, o peptídeo antigênico, e o receptor do linfócito T. Os epítipos componentes da vacina induziram resposta de anticorpos e por linfócitos T de indivíduos portadores de diversas moléculas HLA indicando que o epítipo vacinal é universal.

A vacina foi produzida em duas formulações, 1. na forma de peptídeo sintético e 2. na forma de proteína recombinante e encontra-se em fase experimental em modelos de camundongos (artigos em preparação). Os resultados são promissores, pois os animais respondem ao agente vacinal em combinação com adjuvantes com altos títulos de anticorpos do tipo IgG quando imunizados por via subcutânea e boa resposta de IgA e IgG por via intranasal e não desenvolvem reações de auto-imunidade em tecido cardíaco e outros tecidos analisados, nem citotoxicidade em vários órgãos avaliados (Figura 4).

Vários testes ainda em andamento estão sendo efetuados para confirmação da capacidade de proteção e segurança da vacina.

A produção da vacina contra o estreptococo será extremamente importante para a prevenção das estreptococcias e suas sequelas em nosso país e em diversos países em desenvolvimento e também em países de primeiro mundo, onde o número de faringites estreptocócicas é muito elevado.

Referências

- ABEL, L.C. *et al.* T cell epitope characterization in tandemly repetitive *Trypanosoma cruzi* B13 protein. *Microbes Infect*, 2005; 7(11-12):1184-95.
- _____. Molecular mimicry between cardiac myosin and *Trypanosoma cruzi* antigen B13: identification of a B13-driven human T cell clone that recognizes cardiac myosin. *Braz J Med Biol Res*, 1997;30(11):1305-8.
- BABA, T.W. *et al.* Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat Med*, 2000 Feb;6(2):200-6.
- CUNHA-NETO, E. MHC-restricted antigen presentation and recognition: constraints to gene, recombinant and peptide vaccines in humans. *Braz. J. Med.Biol. Res.*, 1999 32:199-205.
- _____. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J Clin Invest.*, 1996;98(8):1709-12.
- _____. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1995;92(8):3541-5.
- _____. Restricted heterogeneity of T cell receptor variable alpha chain transcripts in hearts of Chagas' disease cardiomyopathy patients.: *Parasite Immunol.*, 1994;16(4):171-9.

8. DAMICO, F.M. *et al.* T-cell recognition and cytokine profile induced by melanocyte epitopes in patients with HLA-DRB1*0405-positive and -negative Vogt-Koyanagi-Harada uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005; 46:2465-2471.
9. DURANTI, M.A. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: conformational preferences of antigenic peptides bearing the immunodominant epitope of the B13 antigen. *Exp Parasitol.*, 1999;93(1):38-44.
10. FONSECA, S.G. *et al.* Identification of novel consensus CD4+ T cell epitopes from clade B HIV-1 whole genome that are frequently recognized by HIV-1 infected patients. *AIDS*, 2006; 20(18):2263-73
11. _____. Identification of multiple HLA-A*0201-restricted cruzipain and FL-160 CD8+ epitopes recognized by T cells from chronically *Trypanosoma cruzi*-infected patients. T cells in the local inflammatory infiltrate of Chagas disease cardiomyopathy. *Microbes and Infection*, 2005; 7:688-697.
12. GUILHERME, L. *et al.* Towards a vaccine against rheumatic fever. *Clin. Immunol. Dev.*, 13: 125-132, 2006.
13. HEENEY, J.L. The critical role of CD4(+) T-cell help in immunity to HIV. *Vaccine*, 2002; 20:1961-63.
14. IWAI, L.K. *et al.* Retro-inverso peptide analogues of *Trypanosoma cruzi* B13 protein epitopes fail to be recognized by human sera and peripheral blood mononuclear cells. *Peptides*, 22:853-60, 2001.
15. _____. T-cell molecular mimicry in Chagas disease: identification and partial structural analysis of multiple cross-reactive epitopes between *Trypanosoma cruzi* B13 and cardiac myosin heavy chain. 2005. *J Autoimmun.*, 24:111-7, 2005.
16. _____. *In silico* prediction of peptides binding to multiple HLA-DR molecules accurately identifies immunodominant epitopes from gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* frequently recognized in primary peripheral blood mononuclear cell responses from sensitized individuals. *Mol Med.*, 9(9-12):209-19., 2003.
17. JORDAN REPORT. 20th Anniversary – Accelerated Development of Vaccines. In: Division of Microbiology and Infection Diseases – National institute of Health, 2002, p.1-261.
18. KALAMS, S.A.; Walker, B.D. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.*, 1998; 188(12):2199-204.
19. KINLOCH-DE LOES, S. *et al.* Impact of therapeutic immunization on HIV-1 viremia after discontinuation of antiretroviral therapy initiated during acute infection. *J Infect Dis.*, 2005 Aug 15;192(4):607-17.
20. LETVIN, N.L. Progress toward an HIV vaccine. *Annu Rev Med.*, 2005;56:213-23.
21. _____. Preserved CD4+ central memory T cells and survival in vaccinated SIV-challenged monkeys. *Science.*, 312(5779):1530-3, 2006.
22. LOWRIE, D.B. *et al.* Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature*, 1999. 400: 269-271.
23. MASCOLA, J.R. *et al.* Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med.*, 2000 Feb;6(2):207-10.
24. MATTAPALLIL, J.J. *et al.* Vaccination preserves CD4 memory T cells during acute simian immunodeficiency virus challenge. *J. Exp. Med.*, 203(6):1533-41, 2006.
25. OLIVEIRA, S.C. *et al.* Immunological properties of gene vaccines delivered by different routes. *Braz. J Med. Biol. Res.*, 1999, 32: 207-214.
26. RIZZO, L.V.; CUNHA-NETO, E., TEIXEIRA, A.R. Autoimmunity in Chagas' disease: specific inhibition of reactivity of CD4+ T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.*, 57:2640-4, 1989.
27. ROSENBERG, E.S. *et al.* Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science*, 1997; 278(5342):1447-50.
28. STURNIOLO, T. *et al.* Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat Biotechnol.*, 1999; 17(6): 555-61.
28. TANEJA, V. *et al.* HLA-DRB1*0402 (DW10) transgene protects collagen-induced arthritis-susceptible H2Aq and DRB1*0401 (DW4) transgenic mice from arthritis. *J Immunol.*, 2003;171(8):4431-8.