

Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Vacinação por via nasal através de nanossistemas no combate do vírus Influenza

Carlota Isabel Barroso Rebola Grilo Letras

Trabalho efetuado sob a orientação de:
Professora Doutora Ana Margarida Grenha

Dissertação para a obtenção de grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

2020

Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Vacinação por via nasal através de nanossistemas no combate do vírus Influenza

Carlota Isabel Barroso Rebola Grilo Letras

Trabalho efetuado sob a orientação de:
Professora Doutora Ana Margarida Grenha

Dissertação para a obtenção de grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

2020

Título: Vacinação por via nasal através de nanossistemas no combate do vírus Influenza

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright © 2020 Carlota Isabel Barroso Rebola Grilo Letras. Todos os direitos reservados.

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Ao fim de cinco anos, dou por finalizado o meu percurso académico, considerando uma das etapas mais marcantes da minha vida. Para oficializar este momento, quero desde já agradecer a todos os que estiveram presentes nesta caminhada e que a tornaram de algum modo única e especial.

Antes de mais gostaria de agradecer à minha orientadora Professora Doutora Ana Grenha, por me aceitar como sua mestranda e sobretudo pela sua paciência e rigor nas suas correções. Agradeço também a todos os professores, equipas do Hospital Universitário de Portimão e da Farmácia Carvalho que de certo modo me despertaram o interesse por temáticas relativas à profissão farmacêutica e me incutiram gosto pela mesma.

Estou sobretudo grata à minha família por todos os valores, conselhos e ensinamentos que me incutiram ao longo da minha vida, pois é muito graças a eles que sou a pessoa que sou hoje. Acima de tudo, estou grata pelos pais que tenho, por serem o meu pilar incondicional e mesmo estando longe por vezes deram-me animo para percorrer este longo caminho e alcançar os meus objetivos. Afinal a persistência é mesmo o caminho para o êxito.

Queria também deixar uma palavra de apreço e um enorme obrigada aos amigos que a universidade me deu, e pelos momentos que partilhámos que decerto irei recordar com carinho. Quero destacar a Clara, a Mariana Gonçalves e ao Hugo que durante estes cinco anos tornaram-se uma extensão da minha família, companheiros de todas as horas, estando presentes tanto nos bons como nos maus momentos.

Por fim, mas não menos importante, aos meus amigos Eborenses, Carolina, Joana, Catarina, Sara, João Pires e Beatriz pelos cafés sempre que eu ia a casa, mostrando que uma amizade pode ser mantida mesmo quando existe distância física. E um obrigado final a todos os não mencionados, mas que mesmo assim fizeram parte destes últimos cinco anos!

Resumo

De acordo com o Programa Nacional de Vigilância da Gripe comprovou-se que na quarta semana de 2019 a taxa de incidência da síndrome gripal, em Portugal, foi 89,3 por cada 100 mil habitantes, considerando-se uma atividade gripal epidémica de intensidade moderada. Atualmente, a gripe é um problema de saúde pública com um impacto significativo no sistema de saúde sendo responsável por inúmeras hospitalizações, mortes e gastos económicos.

A vacinação é a metodologia mais eficaz na prevenção da gripe induzindo respostas específicas de anticorpos para o trato respiratório. Assim, a mucosa nasal do hospedeiro para além de ser o local de infeção viral, também é o local ideal para a produção de uma resposta imunitária prevenindo a infeção.

Portugal implementou o Programa Nacional de Vacinação, contudo a administração da vacina da gripe é considerada facultativa. Atualmente, a maioria das vacinas contra o vírus da gripe são vacinas inativas de administração parenteral em que a proteção contra o agente patogénico é apenas conseguida a nível sistémico.

Com o desenvolvimento de vacinas e introdução de novas estratégias, como a administração por via nasal e a utilização de sistemas de entrega de antigénios, têm emergido como uma ferramenta importante para promover uma resposta imunitária sistémica e local, representando uma mais-valia contra agentes infecciosos do foro respiratório.

Esta monografia apresenta uma revisão bibliográfica da utilização de nanossistemas na produção de vacinas contra o vírus Influenza para administração nasal. O trabalho descreve e compara as vantagens da administração nasal, destacando estudos com a utilização de nanossistemas pela via de administração nasal. Estes estudos sugerem que a utilização de nanossistemas proporcionam maior tempo de retenção na mucosa, contornando a problemática da depuração mucociliar, aumentando, conseqüentemente, a absorção dos antigénios pelo epitélio com a administração de doses mais baixas, havendo redução dos efeitos adversos da vacina.

Palavras-chave: imunização através de nanossistemas; imunização nasal; nanopartículas; vacina da gripe; vírus Influenza.

Abstract

According to the National Influenza Surveillance Program it was found that in the fourth week of 2019 the incidence rate of flu syndrome in Portugal was 89,3 per 100000 inhabitants, indicative of moderate-intensity epidemic influenza activity. Currently, influenza is a public health problem with a significant impact on the healthcare system and responsible for countless hospitalizations, deaths and significant economic expenditures.

Vaccination is considered the most effective methodology for preventing influenza by inducing specific antibodies response in the respiratory tract. Thus, the host nasal mucosa, in addition to be the site of viral infection, is also the ideal place for creating an immune response preventing infection.

Portugal implemented the National Vaccination Program; however, the administration of the flu vaccine is considered optional. Currently, most of influenza vaccines are parenteral inactivated vaccines and their protection against pathogens is only achieved at systemic level.

The advances in vaccine development and the introduction of new strategies, such as nasal administration and the use of antigenic delivery systems, they have emerged as an important tool to promote a systemic and local immune response, representing an added value against respiratory tract infectious agents.

This monograph presents a review of the use of nanosystems in the production of vaccines against influenza virus for nasal administration. Furthermore, the work describes and compares the advantages of the nasal administration of vaccines, highlighting studies with the use of nanosystems through nasal administration route. These studies suggest that the use of nanosystems provides longer retention time in the mucosa, bypassing the problem of mucociliary clearance, consequently increasing the absorption of antigens by the epithelium with the administration of lower doses, reducing the adverse effects of the vaccine.

Keywords: flu's vaccine; Immunization through nanosystems; influenza virus; nanoparticles; nasal immunization.

Índice de Figuras

Figura 4-1-Representação esquemática do virião de Influenza. É possível verificar as glicoproteínas de superfície (hemaglutinina e neuraminidase) que se projetam a partir da superfície do virião, o envólucro lipoprotéico que deriva da membrana citoplasmática da célula hospedeira, a matriz proteínica, e o core constituído pelas ribonucleoproteínas (RNP). Estes RNP são compostos pela nucleoproteína (NP) e pelo complexo da polimerase, que inclui a proteína básica 1 (PB1), a proteína básica 2 (PB2) e a proteína ácida (PA). [Adaptado de (22)].....	9
Figura 4-2- Diagrama do ciclo viral do vírus da gripe. [Adaptado de (23)].....	10
Figura 4-3- Mecanismo que gera variações nos antígenos de superfície (drift) [Adaptado de (22)].....	13
Figura 4-4- Mecanismo que gera variações nos antígenos de superfície (shift) [Adaptado de (22)].....	14
Figura 5-1- Concentração e isótopos de anticorpos no soro durante a primeira e segunda resposta do sistema imunitário ao contactar com o antígeno. [Adaptado de (22)].....	21
Figura 5-2- Resposta imunitária de acordo com a especificidade e memória imunológica do antígeno.[Adaptado de (22)].....	23
Figura 6-1- Distribuição da transmissão dos subtipos do vírus Influenza na época de setembro 2018 e fevereiro 2019 [Adaptado de (52)].....	26
Figura 7-1- Diferentes tipos de nanosistemas [Adaptado de (90)].....	37
Figura 7-2- Representação esquemática de estruturas poliméricas, Nanocápsulas e Nanoesferas [Adaptado de (108)].....	38
Figura 7-3- Determinação de (A) anti-M2 IgG (B) anti-M2 IgA (C) anti-M2 INF- γ no fluido bronco-alveolar (BALF) antes e 4 dias após a infeção de Influenza [Adaptado de (103)].....	40
Figura 7-4-Perfil de libertação de antígeno em nanopartículas de TMC com e sem o adjuvante HPS70c [Adaptado de (103)].....	41
Figura 7-5- Perfil de libertação do antígeno do vírus Influenza, e dos adjuvantes CpG e Quillaia das nanoesferas de PLGA numa solução de PBS a 37°C in vitro [Adaptado de (99)].....	45
Figura 7-6- Representação dos níveis séricos de anticorpos IH (A), de IgG (B) e de IgA (C) induzidos por administração nasal de nanopartículas de PLGA encapsulando vírus Influenza aviário ou pela administração do vírus Influenza aviário inativado inteiro. [Adaptado de (100)].....	46
Figura 7-7- Imunização por mucosa baseada em micelas de polímeros. Os grupos carboxi podem atuar como um mucoadesivo na presença de glicoproteínas da camada de muco (círculo vermelho). Enquanto que as porções de amina podem interagir com a camada de células epiteliais de índole anionico (círculo azul) [Adaptado de (83)].....	48
Figura 7-8- Resposta imune específica contra PR8 do vírus Influenza em ratinhos vacinados por via nasal com 1-PBS; 2- Antígeno PR8 isolado (20mg); 3- PR8 em nanomicela γ -PGA (10 mg); 4- PR8 em nanomicela γ -PGA (100 mg). O gráfico (A) corresponde aos valores relativos aos anticorpos IgG no sono e o gráfico (B) aos anticorpos IgA recolhidos da lavagem nasal [Adaptado de (83)].....	49
Figura 7-9- Taxa de sobrevivência dos ratinhos imunizados com diferentes formulações após exposição do vírus Influenza A/PuertoRico/8/34 (H1N1) [Adaptado (83)].....	50
Figura 7-10- Esquema da formulação da vacina que tem três constituintes, M2, AuNP e o adjuvante CpG, dos quais o M2 está presente tanto na forma imobilizada como solúvel, ao contrário do adjuvante que apenas se encontra na forma solúvel. [Adaptado de (91)].....	51

Figura 7-11- Estrutura e composição do VLP. As VLPs do vírus Influenza podem compreender até quatro proteínas estruturais H (azul), N (vermelho), M2 (verde) e M1 (cinzento) [Adaptado de (127)].....	53
Figura 7-12-(A) IgG específico para M2. Os soros imunológicos foram diluídos em serie e os níveis de IgG contra o péptido M2 foram analisados por ELISA. (B) Isótipos de anticorpos IgG específicos para M2 foram determinados em ratinhos [Adaptado de (128)].....	54
Figura 7-13- Carga viral pulmonar a 3 e 6 d.a.i (dias após a infecção) com a estirpe A/Vietnam/ (rgH5N1) 3 x a LD50 [Adaptado de (125)].....	55
Figura 7-14- (A) Anticorpos IgG específicos para M2 no fluido broncoalveolar nos 0,3 e 6 dias após a infecção (B) Anticorpos IgA específicos para M2 nos 0, 3 e 6 dias após a infecção [Adaptado de (128)].....	55
Figura 7-15- Comparação da produção de anticorpos IgG e IgA entre diferentes formulações e vias de administração (A) Indução do anticorpo IgA específico para M2 pelos sistemas 3M2e-rFH, 3M2e, rHF e PBS. (B) Indução do anticorpo IgG específico para M2 pelos sistemas 3M2e-rHF, 3M2e, rHF e PBS. (C) Indução de Anticorpos IgG e suas subclasses (IgG1 e IgG2a) pelo sistema 3M2e-rFH administrado pela via nasal (n) e intramuscular (i.m) [Adaptado de (130)].....	57
Figura 7-16- Teste de ligação entre o anticorpo IgA presente nas lavagens nasais dos ratinhos imunizados com 3M2e-rFH pela via intranasal com os péptidos M2 de diversos subtipos do vírus Influenza [Adaptado de (130)].....	58

Índice de Tabelas

Tabela 6-1-Doenças ou condições de saúde para as quais está recomendada a vacina contra a gripe [Adaptado de (56)]	29
Tabela 7-1- Eficácia da formulação com nanopartículas de quitosano contra o vírus Influenza A/Sydney em estudo clinico em humanos [Adaptado de (106)]	43
Tabela 7-2- Resultados do potencial zeta e eficácia de encapsulação das diferentes nanoesferas de PLGA [Adaptado de (99)]	44
Tabela 7-4- Considerações éticas no desenho de um modelo de vacina para o combate do vírus Influenza [Adaptado de (147)]	61

Índice de Acrónimos e Abreviaturas

APCs- do inglês, *Antigen Presenting Cells*

BALT- do inglês, *Bronchial- Associated Lymphoid Tissue*

CDC- do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*

CT- do inglês, *Cholera Toxin*

DGS-Direção Geral de Saúde

GALT- do inglês, *Gastrointestinal-Associated Lymphoid Tissue*

GRAS- do inglês, *Generally recognised as safe*

H-Hemaglutimina

ICD- do inglês, *International Classification of Diseases*

IFN- γ – Interferão gama

Ig- Imunoglobulina

INE-Instituto Nacional de Estatística

kDa-kilodalton

LT- do inglês, *Echerichia coli heat-labile enterotoxin*

LUV- do inglês, *Large Unilamellar Vesicles*

MALT- do inglês, *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*

MLV- do inglês, *Multilamellar Vesicles*

mRNA- do inglês, messenger *Ribonucleic Acid*

N-Neuraminidase

NALT- do inglês, *Nasal-Associated Lymphoid Tissue*

OMS-Organização Mundial de Saúde

ORF- do inglês, *Open Reading Frame*

PEG- do inglês, *Polyethylene glicol*

pKa- constante de acidez

PAMPS- (padrões moleculares associados a patogêneos)

PLA-do inglês, *Polylactic acid*

PLGA- do inglês, *poly(lactic-co-glycolic acid)*

RNA- do inglês, *Ribonucleic Acid*

RT-PCR- do inglês, *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction quantitative real time*

SUV- do inglês, *Small Unilamellar Vesicles*

TLR- do inglês, *Toll-Like Receptor*

VLP- do inglês, *virus-like particle*

γ -PGA- do inglês, *gama-polyglutamic acid*

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract.....	v
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas.....	ix
Índice de Acrónimos e Abreviaturas.....	x
1. Introdução	1
2. Objetivos	5
3. Metodologia	6
4. O vírus Influenza.....	7
4.1. Nomenclatura.....	7
4.2. Morfologia e estrutura	7
4.3. Replicação do vírus.....	10
4.4. Variações antigénicas	12
5. Resposta imunológica à infeção do vírus Influenza	15
5.1. Resposta Imunológica Inata	17
5.2. Resposta Imunológica Adaptativa	18
5.2.1. Imunidade Celular	19
5.2.2. Imunidade Humoral.....	20
6. Vacinação contra a gripe	24
6.1. Vacinas licenciadas	25
6.2. Indicações para vacinar	28
6.3. Efeitos Adversos e contraindicações	30
6.4. Estratégias em desenvolvimento.....	31
6.4.1. Via de administração nasal	32
6.4.2. Adjuvantes imunológicos.....	33
6.4.3. Sistemas de entrega de antigénio.....	34
7. Nanossistemas e a sua aplicação na veiculação de vacinas.....	36
7.1. Base polimérica	37
7.1.1. Nanopartículas	37
7.1.2. Micelas	47
7.2. Nanopartículas inorgânicas	50
7.3. Partículas Vírus-Like	53
7.4. Limitações	59
8. Conclusão	63

Bibliografia65

1. Introdução

Segundo a Direção Geral de Saúde (DGS), a gripe é uma doença respiratória aguda contagiosa provocada por uma infeção primária causada pelo vírus Influenza. A transmissão desta patologia, ocorre preferencialmente em meses frios, podendo advir da inalação do vírus infeccioso por diversos mecanismos. Estes últimos incluem o toque entre mãos, superfícies ou objetos contaminados ou através de pequenas partículas em aerossol que são libertadas durante o espirro, tosse ou apenas pela respiração entre pessoas com proximidade inferior a 2 metros. Ao inalarmos a partícula viral, esta deposita-se sobre o muco que cobre o trato respiratório, desencadeando no hospedeiro uma reação local e sistémica no sistema imunitário como resposta à perda de homeostasia do organismo.¹⁻³

Esta doença tem um período de incubação de curta duração, 1 a 4 dias, iniciando-se a manifestação dos sintomas de forma abrupta, resultado da lesão das células epiteliais do trato respiratório. Habitualmente no segundo dia de sintomas ocorre o pico de exacerbação viral, com tendência a minimizar após uma semana.¹⁻³

O quadro clínico caracteriza-se por sinais e sintomas como a febre, tosse, dor de garganta, fadiga, calafrios, prostração e dores musculares não sendo específicos desta patologia. Por vezes estes sintomas podem levar à confusão no diagnóstico, havendo a possibilidade do desenvolvimento de infeções mais graves do sistema respiratório, como pneumonia. Caso os sintomas se mantenham por mais tempo, ou se não houver indícios de melhorias, será imperativo recorrer a unidades de saúde para se proceder a um diagnóstico laboratorial para o despiste de outras viroses do foro respiratório.³

A infeção pelo vírus da gripe está na origem de milhares de óbitos devido a complicações de patologias crónicas tanto a nível respiratório como circulatório. Existe uma especial preocupação com certos grupos etários, sendo categorizados como grupo de risco. Este grupo inclui grávidas, idosos, pessoas com condições crónicas subjacentes com propensão para agravar, contribuindo assim para o aumento de hospitalizações e mortalidade. As crianças têm a particularidade de explorar o mundo através do tato

efetivando a transmissão de maiores quantidades de partículas virais, e constituindo assim um grande risco de transmissão do vírus para a comunidade.^{3,4}

A gripe constitui uma ameaça à saúde pública mundial verificando-se um impacto nos países a níveis demográfico, económico e social. Ao longo da história ocorreram alguns episódios pandémicos relativamente ao vírus Influenza. O primeiro decorreu entre os anos 1918 e 1919, sendo denominado como a Gripe Espanhola, ou como mais conhecido em Portugal, pneumónica. Esta pandemia excedeu os óbitos decorrentes da 1ª Guerra Mundial, atingindo 50 milhões de pessoas em todo o mundo, sobretudo adultos jovens. O vírus Influenza responsável por esta pandemia foi do subtipo A (H1N1) em que o seu reservatório natural são aves, mas por mutações adaptativas ganhou capacidade para infetar humanos.^{5,6}

De acordo com o artigo de João Frada e o Instituto Nacional de Estatística (INE) foram registados 60474 óbitos no continente português sendo que a segunda investida do vírus, no período de agosto a novembro, foi considerada o período mais crítico.^{7,8}

Sempre que se verificam tais pandemias, observa-se um declínio drástico na esperança média de vida. Este impacto levou a um progresso significativo tanto ao nível do sistema de saúde pública como no da saúde, expressando-se em cuidados de saúde centralizados e consolidados, no aumento de recursos económicos despendidos na acessibilidade aos cuidados de saúde e na coordenação da saúde pública a nível nacional e global.^{6,9}

Posteriormente, com os avanços científicos na área da saúde, as pandemias que se sucederam nos períodos 1957-1958 – Gripe asiática A (H2N2), 1968-1969 – Gripe de Hong Kong (H3N2) e 2009-2010 – Gripe A (H1N1), registaram números de óbitos até 4 milhões nos primeiros dois intervalos mencionados e 100 a 400 mil no último. Este decréscimo coincide com o desenvolvimento de terapêuticas antivirais, mais propriamente com a criação de vacinas antigripais, que hoje em dia continuam a ser a intervenção mais eficaz de prevenir a infeção e reduzir os efeitos clínicos. Apesar dos avanços médicos significativos nos últimos 100 anos, existem ainda populações que têm acesso limitado aos cuidados de saúde, as quais provavelmente registarão altas taxas de mortalidade numa possível próxima pandemia. Tal facto é provável devido ao aumento

da urbanização e mobilidade das populações, como também da evolução contínua do vírus Influenza. Devido a mudanças constantes, este consegue transmitir-se rapidamente, tornando-se imprevisível prever o próximo surto.^{4,10}

No ano de 2009, em Portugal criou-se uma rede de laboratórios com o objetivo de diagnosticar a etiologia da gripe coordenada pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Estes dados, juntamente com os valores populacionais foram usados para a ICD (do inglês, *International Classification of Diseases*) de modo a conseguimos identificar os seus períodos de circulação e estimar o excesso de mortes associados com o vírus Influenza.^{3,11}

O diagnóstico da existência de atividade gripal epidémica é conseguido através de análise laboratorial, com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, nomeadamente por RT-PCR quantitativo a tempo real (do inglês, *Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time*). Estes métodos permitem diagnosticar com elevado rigor, sensibilidade, especificidade e rapidez, a etiologia da infeção num leque alargado de vírus respiratórios, incluindo os vírus da gripe como também os seus respetivos tipos e subtipos. Para além disso, RT-PCR permite quantificar os vírus (número de cópias por mililitro) e, deste modo, é possível avaliar a evolução da infeção e a eficácia da terapêutica.^{3,12}

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), existe uma ameaça constante de um futuro surto, pois o surgimento de um novo subtipo do vírus Influenza pode aumentar a taxa de transmissão entre diferentes classes de seres vivos. Por isso, a OMS considera a vigilância e precaução as ações mais adequadas visto que “o custo de um grande surto de gripe superará em muito o preço da prevenção”.¹³

Mundialmente, estima-se que existam 1 bilião de casos de gripe, entre os quais 3 a 5 milhões são registados como casos graves e 290 mil a 650 mil conduzem a mortes por causas respiratórias devido à infeção provocada pelo vírus Influenza.^{13,14}

Perante estes factos é imperioso criar alternativas para os vários desafios existentes que afetam a produção de vacinas do vírus Influenza. Atualmente 90% das vacinas contra o vírus Influenza dependem de ovos embrionados para produção, tecnologia que consiste num processo demorado. Além disso, alguns vírus da gripe estão cada vez

menos aptos a crescer nos ovos, e tendem a sofrer alterações nas características antigénicas após a passagem nos ovos. Isso ressalta a necessidade de diversificar e otimizar as tecnologias atuais de produção, ou seja, utilizar outro tipo de composição e métodos de fabrico mais rápidos, de modo a criar novas vacinas que ofereçam uma proteção mais abrangente e duradora.¹⁵

A OMS tem como objetivo otimizar a nível nacional e internacional as capacidades de intervenção a nível da prevenção, deteção e resposta perante o vírus Influenza, de modo a reduzir o impacto desta infeção viral em termos sazonais e pandémicos. Para alcançar esta missão até 2030, estipularam estratégias e prioridades sobre as quais esta monografia toma relevância, pois debate as inovações de investigações que têm vindo a surgir relativamente ao uso de nanossistemas em formulações de vacinas de administração nasal.^{13,16}

2. Objetivos

Realizando a presente monografia no âmbito de administração de vacinas nasais mediadas por nanossistemas para o tratamento da gripe, será feita inicialmente uma alusão à constituição, modos de replicação e mecanismos evolutivos do vírus Influenza, assim como o mecanismo de imunização no organismo humano após exposição a este agente infeccioso.

De seguida serão apresentadas as vantagens da imunização por via nasal em prol de meios de imunização ditos convencionais, para patologias ou síndromas do sistema respiratório. Por fim, terá lugar de destaque a apresentação e discussão dos resultados de estudos recentes que utilizem nanossistemas para a formulação de vacinas contra o vírus Influenza para a administração nasal. Com a análise destes artigos pretende-se distinguir os diferentes nanossistemas que têm sido objetos de estudo na formulação de vacinas contra o vírus da gripe e o seu contributo para a melhoria da imunização pela via nasal.

3. Metodologia

A dissertação “Vacinação por via nasal através de nanossistemas no combate do vírus Influenza” consiste numa revisão bibliográfica de material científico da referida área, o que se verificou incluir material publicado nos últimos dezanove anos.

Para a realização da dissertação supracitada efetuou-se a pesquisa e recolha bibliográfica de artigos em bases de dados como o PubMed, Frontiers, ScienceDirect utilizando alguns termos-chave para facilitar a pesquisa, como por exemplo, vacinação contra vírus Influenza e imunização nasal contra vírus Influenza.

A pesquisa estendeu-se na recolha de material bibliográfico em websites pertencentes a organizações e instituições com credibilidade científica sobre a temática, sendo estas a OMS, a DGS, o INE e o CDC (*do inglês, Centers for Disease Control and Prevention*) com o intuito de complementar a informação recolhida pelas fontes anteriormente mencionadas.

Para além da pesquisa informática, foram consultados livros referentes à temática na Biblioteca da Universidade do Algarve no Pólo de Gambelas, na Biblioteca Pública de Évora e na Biblioteca da Universidade de Évora.

Após a recolha da informação mais atual e relevante sobre a área procedeu-se à síntese da informação relevante que posteriormente foi introduzida na monografia e devidamente referenciada. É necessário referir que devido à escassez de estudos em humanos de nanossistemas com a aplicação em questão procedeu-se à recolha de artigos com a aplicação de estudos *in vivo* e *in vitro* em animais com similaridades com o nosso sistema nasofaríngeo.

4. O vírus Influenza

4.1. Nomenclatura

A OMS estabeleceu o sistema de nomenclatura dos vírus Influenza em 1971, com revisão no ano 1980. A sua utilização é universal permite facilitar a interpretação dos dados de sequências em diferentes laboratórios e a expansão da árvore filogenética, considerando variações antigénicas. Esta nomenclatura, aceite universalmente, estabelece o seguinte: tipo antigénio (A, B ou C); o hospedeiro de origem quando se refere a uma estirpe não humana; a origem geográfica; o número de ordem da estirpe do laboratório; e por fim, o ano de isolamento. No caso do vírus Influenza do tipo A ao nome da estirpe acresce a designação do subtipo da hemaglutinina (H) e neuraminidase (N).^{3,17}

4.2. Morfologia e estrutura

O agente etiológico da gripe pertence à família *Orthomyxoviridae*, a qual inclui os 7 géneros: Influenza A, Influenza B e Influenza C, Influenza D, thogotovírus, isavírus e quaranjavírus. Os investigadores britânicos Wilson Smith, Andrewes, e Laidlaw identificaram primeiramente o vírus Influenza B no ano 1940, de seguida o Influenza C em 1950 e por fim, Influenza A em 1993 durante uma investigação realizada em furões. Nesta monografia iremos focar em particular os vírus Influenza A e Influenza B, por serem aqueles que têm maior importância para a Saúde Pública, comparando sempre que necessário com o vírus Influenza C.¹⁰

Esta classificação em vírus Influenza A, B e C baseia-se nas características antigénicas das proteínas internas destes vírus, proteína da matriz (M) e a nucleoproteína (NP), que são muito estáveis. Por sua vez, os vírus Influenza A subdividem-se em subtipos segundo a especificidade das duas glicoproteínas de superfície que os constituem, a hemaglutinina (H) e neuraminidase (N). Atualmente são conhecidos 18 subtipos diferentes de H e 11 subtipos de N, cujas várias combinações na

superfície do vírus Influenza A constituem a base da classificação em subtipos. Por sua vez, estes subtipos de vírus Influenza A integram diferentes estirpes. Circulam sazonalmente no Homem estirpes do subtipo de vírus Influenza A(H1N1) pdm09 e do subtipo A(H3N2). Para além destas, verificou-se que durante as epizootias (epidemias nos animais) do vírus Influenza aviário de elevada patogenicidade, pode ocorrer eventualmente, transmissão zoonótica do vírus Influenza das aves para o Homem, apresentando uma expressão mais grave nos subtipos A(H5N1), A(H7N7) e A (H9N9). Por outro lado, o vírus Influenza B não se divide em subtipos, mas sim em duas linhagens, a B/Yamagata e a B/Victoria, que por sua vez, integram várias estirpes de circulação sazonal.^{10,18-20}

Como podemos observar na Figura 4-1, os vírus Influenza são partículas pleomórficas (variam a sua forma de acordo com o seu ciclo reprodutivo), que predominantemente apresenta uma forma esférica, cerca de 100 nm de diâmetro, ou por vezes, uma forma filamentosa, cerca de 1 µm de comprimento. A morfologia das estirpes virais pode variar consoante o substrato utilizado para a sua replicação, pode ser afetada pela polaridade das células epiteliais, pelos microfilamentos de actina e lípidos. Esta é determinada por genes virais específicos (genes que codificam a matriz proteica, M1, o canal protónico formado pela proteína M2 e o gene que codifica a N). Do ponto de vista estrutural, são partículas com involucro que contem um genoma de RNA, segmentado, de hélice simples e de polaridade negativa. Nos vírus Influenza A e B o genoma inclui oito segmentos de RNA enquanto que os vírus Influenza C apenas integram 7 segmentos. Esta diferença reside no facto de os vírus Influenza C codificarem apenas uma proteína de superfície, hemaglutinina-esterase, enquanto que os vírus Influenza A e Influenza B apresentam duas, como já foi mencionado.^{18,19,21}

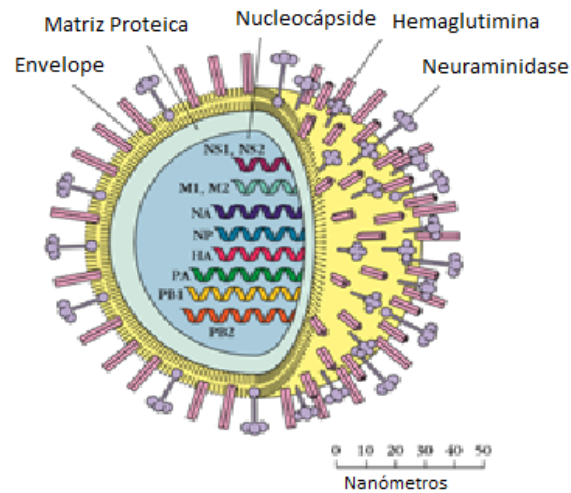


Figura 4-1-Representação esquemática do virião de Influenza. É possível verificar as glicoproteínas de superfície (hemaglutinina e neuraminidase) que se projetam a partir da superfície do virião, o invólucro lipoprotéico que deriva da membrana citoplasmática da célula hospedeira, a matriz proteica, e o core constituído pelas ribonucleoproteínas (RNP). Estes RNP são compostos pela nucleoproteína (NP) e pelo complexo da polimerase, que inclui a proteína básica 1 (PB1), a proteína básica 2 (PB2) e a proteína ácida (PA). [Adaptado de (22)]

Os vírus Influenza A infetam o Homem e uma grande variedade de outras espécies animais, mas é nas aves migratórias que aquáticas que podemos encontrar todos os subtipos, à exceção dos subtipos A(H17N10) e A(H18N11) que foram penas encontrados em morcegos. A aves migratórias aquáticas constituem o reservatório natural de todos os subtipos do vírus Influenza A e a fonte de transmissão para outras espécies animais através dos voos migratórios. Para o vírus Influenza B o Homem é o único reservatório e hospedeiro, sendo que os seus surtos são considerados atípicos e benignos comparativamente com os dos vírus Influenza A. Por fim, os vírus Influenza C infetam o Homem, canídeos e suínos, contudo o seu papel epidemiológico é menor, uma vez que a sua circulação endémica é clinicamente pouco aparente.^{10,20}

4.3. Replicação do vírus

Após uma descrição sobre a organização do genoma e das proteínas virais, iremos prosseguir com uma descrição dos passos gerais do ciclo replicativo do vírus Influenza. Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, ou seja, não prescindem de uma célula para a sua replicação. Após a entrada na célula hospedeira, o vírus necessitará de maquinaria da célula para conseguir produzir novas partículas virais. Todas as etapas que ocorrem numa célula infetada pelo vírus se intitulam de ciclo replicativo. O ciclo de multiplicação do vírus Influenza tem uma duração aproximada de 8 a 10 horas, começando com a adsorção e entrada do vírus na célula hospedeira, seguidas da descapsidação e encaminhamento das RNP para o núcleo da célula infetada, passando depois pela transcrição e multiplicação do RNA e finalizando com a estruturação, maturação e libertação de novos viriões (Figura 4-2).³

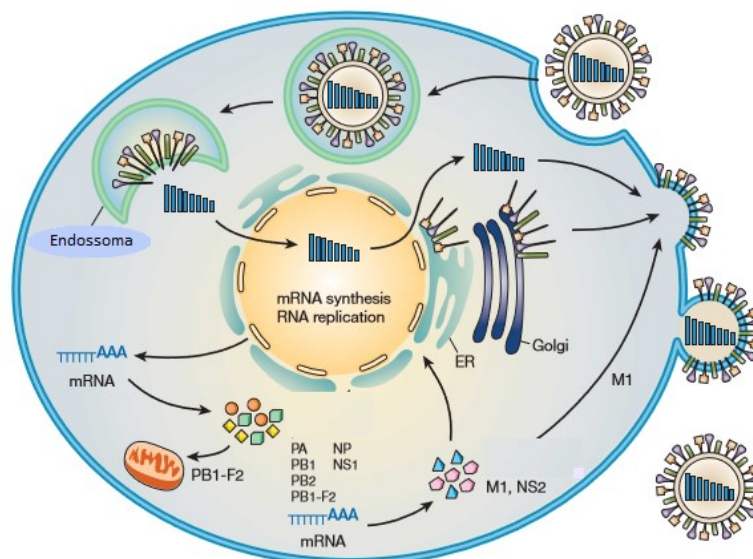


Figura 4-2- Diagrama do ciclo viral do vírus da gripe. [Adaptado de (23)]

Este processo replicativo inicia-se no momento em que a partícula viral entra em contato com a membrana da célula alvo. Todos os vírus para contornarem o primeiro obstáculo, a membrana plasmática, possuem ligandos que interagem especificamente

com os recetos das células do hospedeiro. Esta afinidade acontece através da H do vírus e o ácido siálico presente em mucoproteínas das membranas das células epiteliárias respiratórias. No entanto, este processo não é linear, pois as estirpes do vírus Influenza têm diferentes afinidades, consoante as ligações químicas com os ácidos siálicos. Estas diferenças vão estipular quais as espécies de animais possíveis de infetar.^{3,23,24}

Por outro lado, a glicoproteína N também desempenha um papel fundamental na entrada do vírus na célula. As células epiteliais do trato respiratório são revestidas por muco composto por glicoproteínas que contêm ácido siálico. Quando o virião Influenza, forma infetante do vírus, penetra no sistema respiratório fica preso no muco por se ligar instantaneamente a H aos ácidos siálicos do meio. Esta interação impediria que a partícula viral alcançasse o seu alvo, as células, se as N não atuassem de modo inverso ao clivar a ligação da H com o ácido siálico do muco. Deste modo a partícula viral liga-se à célula e a entrada do vírus é efetuada de forma rápida para que a N não atue indevidamente. É importante frisar que todas as estirpes do vírus Influenza são inibidas pelo muco de forma igual, presumindo que esta característica é uma das que determina a virulência viral. O muco é um agente tão protetor quanto maior for o equilíbrio entre a ação da H e da N.²⁵⁻²⁷

Após a ligação do virião ao recetor da célula hospedeira, mediada pela H, o vírus penetra na célula através de vesículas de endocitose revestidas por clatrina. Por ação do canal iónico formado pelas proteínas M2, verifica-se a acidificação das vesículas de endocitose que entre o pH de 5 e 6,5 induzem modificações na estrutura e conformação da H, havendo a fusão da membrana viral e a membrana lipídica endossomal numa só membrana. Durante este processo também se verifica a destabilização da ligação entre a proteína M1 e a ribonucleoproteína (RNP), permitindo a sua libertação no citoplasma e o seu encaminhamento para o núcleo através de sinais de localização mediados pela NP. As RNP entram no núcleo através dos poros nucleares. A transcrição tem início com a associação da atividade da polimerase do virião com polimerase II celular. Isto significa que a polimerase II celular sintetiza os pré-RNA celulares que vão ser capturados através da atividade endonuclease da polimerase viral na região *cap 5'* dos mRNA tendo a função de *primers*. Ou seja, o RNA viral liga-se à subunidade PB1 enquanto a subunidade PB2 estabelece ligação com os *cap 5'* dos mRNA que vão ser clivados pela atividade da

endonuclease localizada no domínio N-terminal da subunidade PA. Durante esta etapa, o alongamento das novas cadeias de mRNA acontece pela adição de nucleótidos associada à subunidade PB1 da polimerase. Estes novos mRNAs apresentam cadeia de sentido positivo e são cópias incompletas do RNA viral com terminações poli(A) e outra *cap*. Os mRNA recém-sintetizados são exportados do núcleo para o citoplasma pelos poros nucleares. Durante a transcrição primária, as primeiras proteínas codificadas pelos mRNA iniciais são a NP, a NS1 e as subunidades da polimerase, constituintes essenciais para a síntese do RNA complementar. A transcrição secundária ocorre aproximadamente 2 horas após a infecção com a síntese do novo RNA viral. Também é no núcleo que decorre a replicação do genoma viral com a síntese de RNA complementar de sentido positivo que serve de molde para a produção dos RNA virais de cadeia negativa. Quer o RNA complementar quer o RNA viral contêm um terminal 5' trifosfato indicador do processo de síntese sem necessidade de *primers*.^{22,24,28}

A tradução dos mRNA acontecem no citoplasma da célula infetada, codificando as várias proteínas estruturais e não estruturais, onde a M2, H e N são traduzidas em associação com o retículo endoplasmático. Durante o transporte da M2, H e N através do complexo de Golgi, verifica-se adição de grupos acil e cadeias laterais de hidratos de carbono até à sua incorporação na membrana citoplasmática da célula infetada. Por sua vez, as RNP recém-formadas vão ser exportadas do núcleo para o citoplasma e associadas à M1 são transportadas para a superfície celular onde as glicoproteínas foram inseridas. A proteína M1 desempenha um papel importante na reunião dos segmentos de RNP como também na libertação de novas partículas virais por gemulação.^{22,28}

4.4. Variações antigénicas

Os vírus Influenza têm uma grande aptidão de se modificar e evoluir, manifestando a capacidade de reinfectar a população. A capacidade de transmissão interespecies e o conseqüente rearranjo de segmentos genómicos, através de

recombinação genética, entre vírus de origem diferentes vai aumentando devido ao facto da maior mobilidade por parte da população.^{1,20}

A manifestação de variabilidade genética e antigénica do vírus ocorre principalmente no tipo A podendo assumir uma expressão *minor* e mais frequente ou *major*, correspondendo a um acontecimento mais esporádico. É possível ocorrer no tipo B, porem é menos provável devido à sua maior estabilidade, já que possui apenas um reservatório.⁴

A expressão *minor*, também conhecida por derivações *drifts*, resulta da acumulação de mutações pontuais no processo de replicação dos segmentos que originam H e N, alterando assim o tipo de aminoácido no epítipo das proteínas (Figura 4-3). Assim, o vírus sofre uma alteração gradual e anual colocando em causa a eficácia dos anticorpos protetores que tenham sido produzidos pelo sistema imunitário do hospedeiro. Este fenómeno acontece todos os anos, influenciando a duração e intensidade das epidemias anuais da gripe. É por causa das variações antigénicas *minor* que existe a necessidade de modificar a composição da vacina da gripe anualmente em cada hemisfério.^{3,4,22}

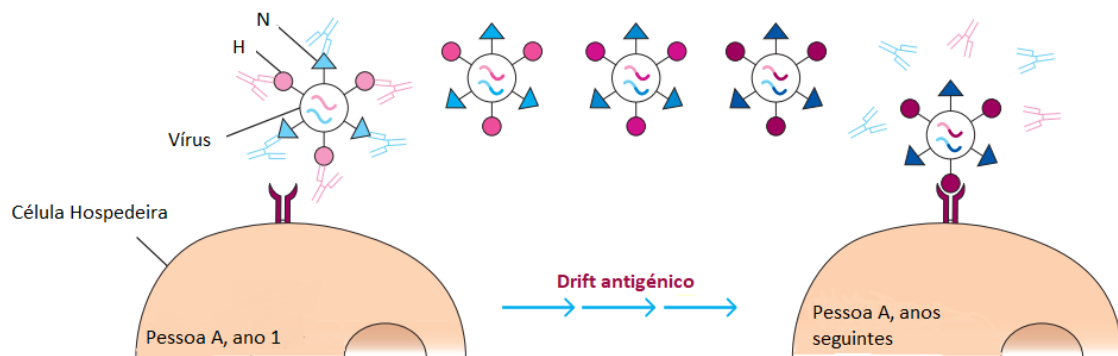


Figura 4-3- Mecanismo que gera variações nos antígenos de superfície (drift) [Adaptado de (22)]

Os vírus Influenza ainda podem sofrer variações mais drásticas e raras, designadas por variações antigénicas *major*, ou por *shifts* antigénicos. São processos que envolvem a transmissão zoonótica e resultam não só da alteração de algumas glicoproteínas de superfície de vírus Influenza sazonais, mas também da alteração dos genes que sustentam a virulência e o poder de transmissão do novo vírus. É este tipo de variações que permite o surgimento de uma nova estirpe, para a qual a população apresenta pequena ou nenhuma imunidade, proporcionando pandemias (de frequência superior a 10 anos) associadas a elevadas taxas de morbidade (Figura 4-4).^{3,4,22}

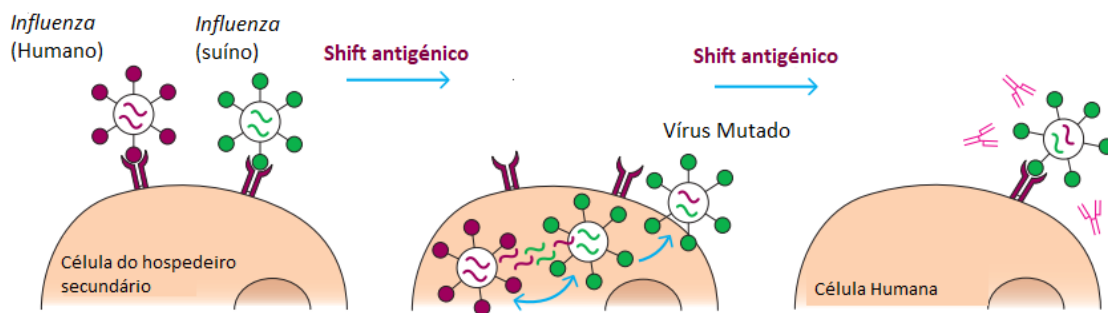


Figura 4-4- Mecanismo que gera variações nos antígenos de superfície (shift) [Adaptado de (22)]

O mecanismo das variações major é possível explicar através de dois modelos. Num dos modelos, o rearranjo dos segmentos genómicos entre vírus Influenza aviário e o vírus Influenza humano ocorre quando infetam o mesmo hospedeiro, normalmente os suínos. Estes animais por conterem no seu epitélio respiratório recetores de ácido siálico associados à galactose por intermédio de uma ligação α 2-6, preferencial dos vírus de origem humana, e α 2-3, preferencial do vírus de origem aviária. Num segundo modelo está implícito que o Homem pode ser diretamente infetado por um vírus de origem aviária, que através de sucessivas mutações (mutação adaptativa), pode ganhar a capacidade de transmitir no ser humano. Deste modo, para que o vírus se transmita a um novo hospedeiro, está sujeito à pressão seletiva de um ambiente novo e à pressão relativa à especificidade de ligação ao recetor das células.^{3,23,24}

Num período pós- pandêmico, existe a possibilidade de um mesmo subtipo do vírus Influenza suportar diversas variações antigênicas *drift* sem ocorrer a alteração do subtipo.³

5. Resposta imunológica à infecção do vírus Influenza

Agora que conhecemos o mecanismo de replicação do vírus Influenza já podemos considerar o agente infeccioso como causador de uma doença, patogênese viral, e de todos os processos imunitários desencadeados no organismo do hospedeiro.

O sere humano não é tantas vezes infetado devido à existência de mecanismos imunitários não específicos (sistema imune inato) e específicos (sistema imune adaptativo) que são chamados para combater e eliminar a invasão do organismo por uma substância. Assim, o resultado final da infecção depende da capacidade do organismo hospedeiro em gerar uma resposta imunitária efetiva perante uma infecção viral.^{29,30}

O trato respiratório é considerado a via de entrada viral mais comum visto que tem uma elevada área de mucosa exposta e uma elevada taxa de ventilação em repouso. O vírus ao entrar na cavidade nasal depara-se primeiramente com uma componente imunitária não-específica, como a temperatura, o pH do organismo humano (barreiras químicas) e com células ciliadas e muco que é secretado por células caliciformes (barreiras físicas). As partículas virais podem ficar aprisionadas no muco da cavidade nasal, do sistema respiratório superior e em parte do inferior. Por outro lado, se atingirem o trato respiratório inferior, enfrentam a barreira mucociliar, que após o aprisionamento das partículas virais impele o muco no sentido ascendente por ação ciliar, culminando na sua deglutição ou até proporcionando o reflexo de tosse ou espirro. Caso as partículas consigam eludir estes mecanismos de defesa e progridam no trajeto, atingem a região alveolar são internalizadas e digeridas por células fagocíticas, como os macrófagos e células dendríticas.^{22,31-33}

Considerando que a maioria dos agentes infecciosos invadem o nosso organismo por via mucosa (oral, nasal, dérmica, vaginal ou rectal), os órgãos linfóides têm um papel fulcral na proteção do organismo. Estes são tecidos organizados que têm grandes

quantidades de linfócitos permitindo a interação destes com células não linfóides. Assim, os órgãos linfóides categorizam-se em primários ou centrais, locais onde ocorre a produção e maturação dos linfócitos, e secundários ou periféricos, locais onde os linfócitos são estimulados após o contacto com os antígenos, dando início à resposta imune. Os órgãos centrais são a medula óssea vermelha, única estrutura capaz de produzir células sanguíneas, e o timo. Tanto os linfócitos B como os T surgem na medula óssea, contudo sofrem o processo de maturação em locais distintos, os B na medula óssea e os T no timo. Após maturação, ambos têm como destino os órgãos linfóides periféricos, onde vão participar na génese da resposta imunitária.²² Os órgãos linfóides periféricos são compostos por gânglios linfáticos, pelo baço, tonsilas, adenóides, apêndice e placas de Peyer, considerando-se especializados na captura do antígeno.^{22,34,35}

Os órgãos linfóides secundários estão associados a MALT (do inglês, *Mucosa-associated-lymphoid-tissue*), estando distribuídos por várias partes do organismo:

- NALT (do inglês, *Nasal-associated-lymphoid-tissue*), que nos humanos corresponde à região do Anel de Waldeyer, sendo constituído pelas amígdalas e os adenóides. Esta estrutura linfóide constitui um sistema de defesa do tubo respiratório e digestivo;
- BALT (do inglês, *Bronchus-associated-lymphoid-tissue*), que consiste em agregados linfocitários nos pulmões e nos brônquios que nos humanos só aparecem após infeção ou inflamação;
- GALT (do inglês, *Gut-associated-lymphoid-tissue*), inclui estruturas especializadas do intestino delgado e as placas de Peyer;
- Entre outros MALT.^{34,36}

Em conjunto, estima-se que o MALT contenha tantos linfócitos como o restante organismo. Cada MALT atua a favor do mesmo princípio, na captura do antígeno no local de infeção pelas células dendríticas apresentando-os aos linfócitos (Natural killer, linfócitos B e linfócitos T). Este processo desencadeia o início de uma resposta imune mais específica sendo o sistema imunitário inato e adaptativo elementos integrantes.^{22,34,33}

5.1. Resposta Imunológica Inata

O sistema imunitário inato é a primeira linha de defesa do organismo com a qual o indivíduo já nasce. Proporciona uma resposta rápida, não específica e de tempo limitado aos agentes patogênicos. Se o agente patogênico sofrer uma variação antigénica que resulte numa nova estirpe, e invadir pela segunda vez o hospedeiro irá haver a indução de uma nova resposta inata, tal como da primeira vez a que foi exposto. Acresce que a resposta ao vírus é independente da quantidade a que o organismo é exposto.^{22,33}

A resposta imune inata é composta por barreiras física, barreiras químicas, por células efetoras (neutrófilos, células dendríticas, linfócitos, eosinófilos), citocinas e recetores de reconhecimento padrão, integrando os TLR (do inglês, *Toll-like recetor*).^{22,33,37,38}

Uma propriedade chave do sistema imunitário inato é a capacidade de reconhecimento do vírus e de o considerar como estranho. Tal acontece quando os PAMPs (padrões moleculares associados a patogéneos) expressos na superfície do vírus se ligam aos TLR expressos nas células do sistema imunitário (macrófagos e células dendríticas). Aquando esta ligação, os macrófagos e células dendríticas produzem citocinas, moléculas que emitem sinais entre células no desencadeamento de respostas imunes, sendo normalmente um dos primeiros indícios de que o hospedeiro foi infetado pelo vírus. As primeiras citocinas a serem secretadas pelas células infetadas são as interferões alfa (IFN- α) e beta (IFN- β), o fator de necrose tumoral e interleucinas (IL-6 e IL-12), sendo que as primeiras mencionadas limitam a replicação viral precocemente. Ao entrarem em circulação, as citocinas induzem reações inflamatórias locais como também sintomas típicos de infeções por Influenza, como febre, mialgias, perda de apetite e letargia. Numa reação inflamatória os primeiros agentes fagocitários que chegam ao local são os neutrófilos por serem bastante abundantes no sangue. Por sua vez as células dendríticas e macrófagos patrulham o organismo em busca de sinais de infeção sendo responsáveis pela ingestão e digestão do antígeno. À medida que absorvem as partículas virais produzem mais citocinas de modo a ampliar o sinal da resposta inicial.^{22,33}

Em muitas infecções virais é suficiente a ação precoce de citocinas produzidas quer por células infectadas pelo vírus, quer por células dendríticas para eliminar o agente patogénico. Se por algum motivo o sistema inato for sobrecarregado ou a replicação do vírus Influenza não abrandar, as defesas de segunda linha ou de atuação específica têm que ser mobilizadas para o local para que o hospedeiro sobreviva.^{22,33}

Em conclusão, os mecanismos redundantes da imunidade inata fornecem uma resposta de primeira linha à infeção por vírus Influenza, contribuindo para o seu controlo. No entanto, em certos casos, a resposta imune inata é também responsável pelos efeitos patológicos observados na infeção por vírus Influenza A. A produção desregulada e desproporcionada de citocinas e quimiocinas e o recrutamento desmesurado de células inflamatórias (macrófagos e neutrófilos) estão diretamente relacionados com o aumento de morbidade e mortalidade verificados em alguns surtos por vírus Influenza A (por exemplo, pandemia por variantes do subtipo A (H1N1) em 1918 e 2009). Nesses mesmos surtos verificou-se que a causa de morte predominante foi a sobreinfeção bacteriana. As causas para essa maior suscetibilidade à infeção secundária por bactérias resultam quer da destruição das células da mucosa respiratória, o que diminui a eficácia da barreira epitelial, quer da desregulação das funções das células envolvidas na resposta imune inata e adaptativa.³⁹

5.2 Resposta Imunológica Adaptativa

A qualidade da resposta imune inata tem consequências na resposta adaptativa que lhe segue, sendo a comunicação entre eles essencial para a capacidade de ajuste a um certo patógeno. Na resposta adaptativa, também denominada específica ou adquirida, ocorre o recrutamento de células imunes especializadas que desencadeiam os mecanismos de imunidade adaptativa, permitindo a inativação do vírus, a destruição de células infectadas e a imunidade protetora necessárias à prevenção, cura e convalescença da infeção.^{22,33,40}

5.2.1. Imunidade Celular

Enquanto que a imunidade humoral, mediada por anticorpos, é essencial para a prevenção de novas infeções, a imunidade celular é importante para a depuração viral durante a infeção por vírus Influenza.³³

A resposta por linfócitos T CD4+ é desencadeada após o processo de apresentação de antígenos mediados principalmente por células dendríticas, tal como foi referido neste capítulo. Relativamente à infeção por vírus Influenza, a imunidade celular é essencial para promover a produção de anticorpos por parte dos linfócitos B e ainda para desencadear a resposta citotóxica específica mediada pelos linfócitos T CD8+.^{33,40}

Os linfócitos T CD4+ de memória, induzidos aquando de uma primeira infeção por vírus Influenza, são essenciais para inibir a replicação viral durante infeções subsequentes. Esta proteção deriva quer de mecanismos efetores diretos quer de mecanismos indiretos mediados por funções reguladoras e auxiliares. É de realçar que esta inibição é ativa contra vários subtipos do vírus Influenza, ao contrário do que normalmente acontece para os anticorpos neutralizantes. Este facto é de extrema relevância, pois pode constituir a base de novas estratégias vacinais que permitam induzir uma imunidade cruzada quer para variantes sazonais, quer para estirpes pandémicas.^{41,42}

A resposta por linfócitos T citotóxicos (linfócitos CD8+) é essencial para eliminar as células infetadas e, assim, permitir o controlo da replicação viral. No caso da infeção por vírus Influenza A, a resposta pelas células T citotóxicas é predominantemente dirigida para epítomos presentes nas proteínas M1, NP, PA e PB2. Devido à baixa variabilidade antigénica associada a estas proteínas, esta resposta é eficaz contra diferentes subtipos do vírus. Tal como descrito para a resposta por linfócitos T CD4+, após uma infeção inicial, neste caso também se verifica a permanência de uma população de linfócitos T CD8+ de memória que possibilita o desencadear de uma resposta imunológica mais vigorosa e precoce aquando de infeções subsequentes.^{40,43}

5.2.2. Imunidade Humoral

Os linfócitos B são os principais responsáveis pela resposta humoral, pois são capazes de produzir e libertar anticorpos. Os anticorpos são glicoproteínas que estão abundantemente presentes no plasma, comumente conhecidos como imunoglobulinas (Ig), que estão encarregues de identificar e eliminar os elementos que são estranhos ao nosso organismo. Estruturalmente, as Igs são compostas por duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas também idênticas. A ligação entre as cadeias leves e pesadas é através de pontes dissulfeto, que variam em quantidade e posição entre as diferentes classes de anticorpos. Além disso, ambas as cadeias possuem uma região variável e outra constante, sendo que o domínio variável confere especificidade ao anticorpo. Para que os linfócitos B iniciem a sua produção é preciso primeiro que ocorra a ligação entre estes e os antígenos. Esta ligação ocorre numa região próxima das extremidades da cadeia pesada e leve do antígeno, a qual se intitula de epítopo. Sendo esta uma região hipervariável, qualquer vertebrado pode produzir milhões de anticorpos que se podem ligar a muitos antígenos diferentes. A partir daí os linfócitos B diferenciam-se em células de memória e em plasmócitos (células inflamatórias capazes de produzir imunoglobulinas e que são abundantes em locais onde penetram organismos invasores e onde existe uma inflamação crónica).^{22,37}

Os anticorpos produzidos no decurso da infeção viral têm como alvo principal as regiões mais expostas das moléculas H e N presentes no invólucro viral, bem como a proteína transmembranar M2. Os anticorpos dirigidos para H neutralizam a infecção viral, diminuindo a capacidade de infeção de novas células, sendo, por isso, considerados os únicos verdadeiros neutralizantes. Eles atuam bloqueando o local de ligação ao recetor celular e/ ou bloqueando a fusão do invólucro viral com a membrana do endossoma, após a endocitose. Pelo contrário, os anticorpos dirigidos para a N não são neutralizantes, embora limitem a produção de partículas virais infecciosas através da inibição da atividade enzimática da N. Desta inibição resulta uma menor severidade dos sintomas e ela associados. Por último, os anticorpos dirigidos para a proteína transmembranar M2 facilitam os mecanismos de citotoxicidade celular. Devido ao facto

da proteína M2 ser conservada antigénicamente, estes anticorpos têm a capacidade de serem ativos contra vários subtipos diferentes de vírus Influenza.⁴⁴

Após a infeção por vírus Influenza, são detetados anticorpos específicos pertencentes às classes IgM, IgA e IgG, que diferem nas sequências de aminoácidos da região constante das cadeias pesadas. Os anticorpos séricos IgA apresenta-se numa concentração no organismo bastante superior comparativamente às restantes classes mencionadas e parecem ser sinónimo de infeção recente. Para além de que a sua presença seja predominante no muco da mucosa promovendo a proteção das células epiteliais no trato respiratório. A IgA tem um poder de resistência à degradação por proteases presentes nas mucosas, bastante elevado e ainda consegue impedir ou dificultar estereoquimicamente que as glicoproteínas H da superfície do vírus Influenza se liguem à célula hospedeira. Deste modo podemos considerar que a IgA tem especificidade para os epítomos, embora esta possa ser facilmente ultrapassada pela ocorrência de um *drift* antigénico. Os anticorpos IgM ativam o sistema complemento e tem a capacidade de neutralizar o vírus. De acordo com a Figura 5-1, é possível verificar que existe diferenças nas concentrações entre os anticorpos IgM e IgG tanto no primeiro contacto com o vírus como no segundo.^{22,40,45}

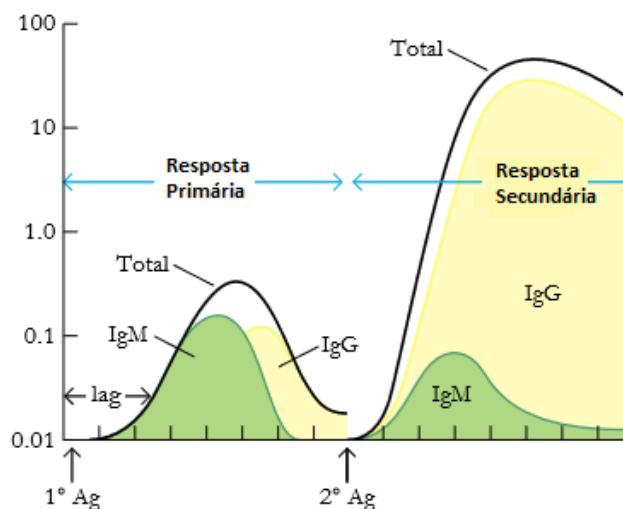


Figura 5-1- Concentração e isótipos de anticorpos no soro durante a primeira e segunda resposta do sistema imunitário ao contactar com o antígeno. [Adaptado de (22)]

A resposta primária tem início 5 a 10 dias após o contacto com o antigénio, onde é característica uma maior e mais rápida expressão da IgM relativamente à produção de IgG, sendo estes responsáveis por ativarem o sistema complemento e neutralizar o vírus. Enquanto que a resposta secundária se desencadeia mais rapidamente, 1 a 3 dias após o contacto, e o anticorpo IgG é produzido em maiores quantidades no soro e permanece no organismo durante mais tempo (aproximadamente 21 dias). Estes anticorpos, IgG, estão associados à proteção contra novas infeções e são a base do efeito protetor desencadeado nas vacinas.^{22,45}

De acordo com a imagem anterior, podemos verificar que existem algumas diferenças relativamente às duas respostas imunes. A indução da resposta secundária inicia logo após uma diminuição ligeira dos níveis de anticorpos da resposta primária, deduzindo então que o sistema imunitário está muito mais sensibilizado para este antigénio, não necessitando de ser exposto a uma dose tão elevada do mesmo. Relativamente às fases que compõem a curva de concentração dos anticorpos, o período entre o contacto com o antigénio e o início da atividade imunológica, tempo de latência (lag) é bastante mais curto, na fase exponencial a concentração de anticorpos no soro é atingida em níveis mais elevados e mais rapidamente. A fase após o pico de concentração de anticorpos designa-se de fase *plateau*, consistindo numa fase mais duradoura em que o declínio não é tão proeminente. Apesar da sua concentração decresce ao longo dos seis meses seguintes, promove a proteção à possível reinfeção pela mesma estirpe, já que não são essenciais para que o hospedeiro recupere. Por isso, quando ocorrer uma segunda infeção com o mesmo vírus ou com um vírus semelhante, ocorre uma resposta mais rápida do anticorpo devido à especificidade e memória imunológica.

5.2.2.1. Memória imunológica

Quando os agentes patogénicos não sofrem alteração suficiente nos epítomos-chave, recorre-se à reativação das células de memória que já têm imunidade pré-formada. Estas células especializadas rapidamente reconhecem o antígeno formando uma resposta mais rápida e eficaz que no primeiro contacto. Assim, é possível combater a infeção sem necessitar de montar uma resposta primária novamente, significando que o sistema imunológico ignora as mudanças subtis que ocorrem a cada ano na estrutura antigénica do vírus Influenza. Por vezes, o agente infeccioso sofre alterações suficientes, originando "novos" epítomos, ou um número de alterações suficiente de epítomos-chave que implica a ocorrência de uma nova resposta primária. A produção de uma nova resposta primária não é coincidente em todos os hospedeiros, pelo que os casos graves de gripe não ocorrem com tanta frequência, exceto nos anos que coincidem com pandemias (Figura 5-2).^{22,45,46}

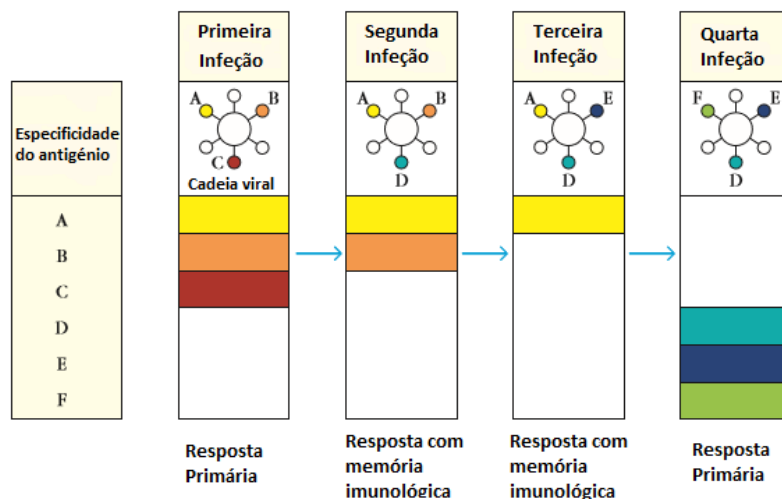


Figura 5-2- Resposta imunitária de acordo com a especificidade e memória imunológica do antígeno.[Adaptado de (22)]

Quando mencionamos ter imunidade para um determinado vírus referimo-nos ao facto de possuímos memória imunológica contra este. Apesar da resposta inata demorar dias a ser executada, a resposta associada a memória imunológica desenvolve-se em poucas horas após a infeção. Deste modo as células de memória, um subconjunto

de linfócitos B e T, permanecem no organismo durante anos, prontas para atuarem rapidamente se houver um encontro subsequente com o agente patogénico.^{30,35,37}

Por último, a eficiência da resposta secundária dependerá do tempo decorrido desde o primeiro contacto com o antígeno, ou seja, será pior sucedida se o intervalo de tempo for muito curto ou muito extenso. No primeiro panorama, o anticorpo proveniente da resposta imunitária primária tem uma permanência no organismo bastante curta não desempenhando adequadamente o seu papel de proteção. Se a segunda exposição ao antígeno for após alguns anos é previsível que a concentração das células de memória do organismo seja muito menor, pois a sua concentração não é persistente.^{45,46}

Utilizando-se desse princípio, a vacina surge desta forma com um papel muito relevante, pois proporciona de forma artificial o primeiro contacto com o antígeno de modo a adquirir imunidade a este. Assim, se o organismo humano for exposto de novo à mesma partícula viral, é capaz de fazer um reconhecimento mais rápido e eficiente com menos dependência do sistema imune inato.^{22,33,40}

6. Vacinação contra a gripe

A OMS emite, bianualmente, recomendações técnicas quanto às estirpes do vírus Influenza que devem constar na composição da vacina na época seguinte. Esta avaliação tem de ser revista anualmente devido ao facto da sazonalidade epidémica da gripe, e da capacidade evolutiva do vírus da gripe que, de modo contínuo, altera as suas características antigénicas para contornar o nosso sistema imunitário, proporcionando à vacina uma proteção limitada. As recomendações são feitas com base na previsão dos vírus que irão circular nos meses seguintes no hemisfério norte e no hemisfério sul, resultando da análise de dados epidemiológicos e virológicos colhidos pelo sistema de vigilância da gripe, (do inglês, *WHO's Global Influenza Surveillance and Response System*), coordenado a nível mundial pela OMS.^{2,13,47}

6.1. Vacinas licenciadas

De forma geral gerais, as vacinas podem ser classificadas conforme incluam vírus inativado ou atenuado, segundo o modo de produção, a utilização de adjuvantes, via de administração e o número de estirpes do vírus da gripe que a constituam.^{48,49}

Vacina inativada

A vacina inativada é produzida com vírus “mortos” por processos químicos ou com os seus fragmentos, podendo classificar-se em vacina de vírus total, vacina de viriões fragmentado ou vacina subunitária. Em muitos países, a vacina produzida à base de vírus total tem vindo a ser substituída por vacinas subunitárias ou de fragmento por provocarem mais reações adversas. Na vacina do tipo viriões fragmentado, o viriões sofre um processo de fragmentação com a utilização de detergentes, ao passo que, na vacina subunitária, a H e N (glicoproteínas de superfície onde se localizam os principais antígenos do vírus da gripe) sofrem um processo de purificação para remoção de outros componentes do vírus. A grande diferença entre ambas reside no facto de a vacina do tipo viriões fragmentado conter antígenos de superfície e estruturais, enquanto que a vacina subunitária tem apenas antígenos de superfície.⁵⁰

Desde 1977 que as vacinas são classificadas como trivalentes incluindo três estirpes do vírus da gripe sazonal (uma estirpe do subtipo A (H3N2), uma estirpe do subtipo A (H1N1), uma estirpe do tipo B, da linhagem Victoria ou da linhagem Yamagata). Como as vacinas trivalentes apenas incluíam uma linhagem do tipo B, havia uma limitação na imunidade fornecida pelas vacinas às estirpes da outra linhagem existente. Nas épocas de 2001/2002 e 2010/2011, a eficácia da vacina considerou-se limitada não prevenindo os casos de gripe, pois a estirpe do tipo B em circulação não era concordante com a da vacina.^{47,51}

A partir daí, as vacinas começaram também a classificar-se como quadrivalentes, e comercializadas em Portugal no inverno de 2018/2019. Durante o período de setembro de 2018 a fevereiro de 2019 verificou-se a predominância do vírus Influenza A por todo o globo, sendo que as estirpes, A(H1N1) pdm09 e a A(H3N2) foram as que circulavam

em maioria na Europa. Além disso, o vírus Influenza B foi detetado unicamente no hemisfério sul, em números globais reduzidos, sendo consideradas relevantes as estirpes B/Victoria/2/87 e B/Yamagata/16/89(Figura 6-1).⁵²

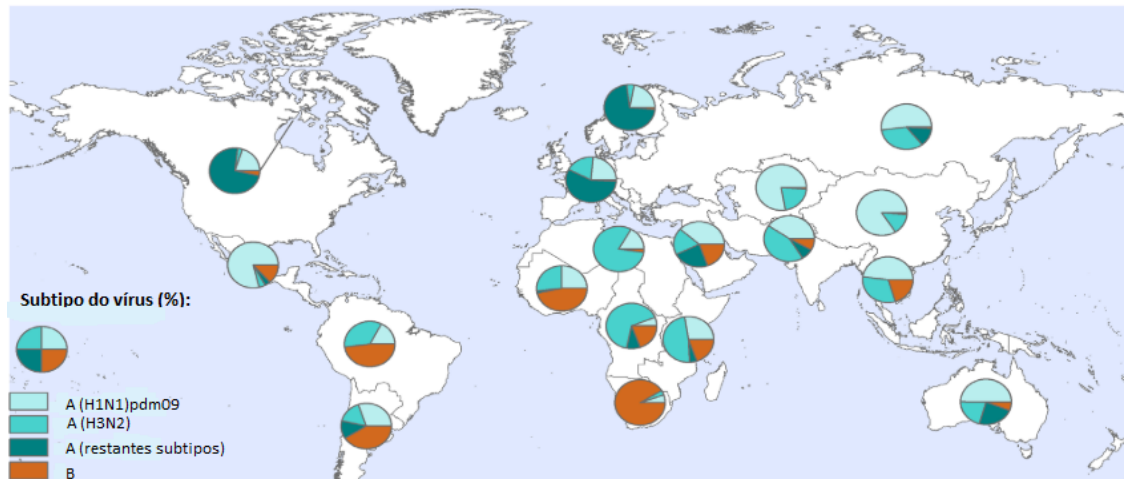


Figura 6-1- Distribuição da transmissão dos subtipos do vírus Influenza na época de setembro 2018 e fevereiro 2019 [Adaptado de (52)]

A estirpe A (H1N1) pdm09 apresenta uma mutação que leva à substituição da H1, sendo desta forma semelhante à constituição da vacina A/Brisbane/02/2018. O vírus da linhagem B/Yamagata/16/89 está relacionado de forma antigénica com a cepa B/Phuket/3073/2013 e os vírus Influenza de linhagem B/Vitoria/2/87 têm uma ação no organismo humano semelhante à cepa B/Colorado/06/2017.^{52,53}

Desta forma, a composição recomendada para a vacina quadrivalente contra Influenza para a temporada de setembro de 2019 a fevereiro de 2020 no hemisfério norte compreende:

- Uma estirpe viral A (H1N1) pdm09 idêntica a A/Brisbane/02/2018;
- Uma estirpe viral A(H3N2) pdm09 idêntica a A/Kansas/14/2017;
- Uma estirpe viral B (linhagem Victoria) idêntica a B/Colorado/06/2017;
- Uma estirpe viral B (linhagem Yamagata) idêntica a B/Phuket/3073/2013.

Se considerarmos a vacina trivalente, é recomendada a utilização de uma estirpe viral B (linhagem Victoria) idêntica a B/Colorado/06/2017.^{52,53}

Em Portugal todas as vacinas disponíveis para combater o vírus da gripe são inativadas de administração intramuscular.^{36,54}

Vacina viva atenuada

A vacina viva atenuada, como o nome sugere, é produzida a partir de estirpes “enfraquecidas” do vírus. Os genes da H e da N dos vírus sazonais são introduzidos em vírus de estirpes mutantes adaptadas ao frio e termossensíveis. Assim este vírus têm a capacidade de se replicar a baixas temperaturas, mas não a temperaturas superiores a 37°C, o que, na prática, corresponde a que sejam capazes de replicação no trato respiratório superior (fossas nasais e faringe), mas não noutros locais do organismo humano onde a temperatura é mais elevada, nomeadamente, no trato respiratório inferior (brônquios e pulmões).^{49,50}

Este tipo de vacina induz a produção de um menor nível de anticorpos séricos do que a vacina inativada, mas, por outro lado, induz o aumento de anticorpos ao nível da mucosa nasal e desencadeia uma resposta imunológica celular mais efetiva. A magnitude deste efeito parece ser mais marcada em crianças do que em adultos.⁵⁰

Tal como a vacina inativada, a vacina atenuada pode ser trivalente ou quadrivalente. Esta vacina de administração intranasal, mimetiza a infeção natural, induzindo deste modo uma melhor resposta imunitária do que a vacina inativada. No entanto, a administração de vacinas vivas atenuadas pode desencadear a própria doença no indivíduo a imunizar, especialmente em indivíduos imunocomprometidos.^{50,55}

Vacina recombinante

Neste tipo de vacinas, a H é produzida através de tecnologia de recombinação, sem necessidade de replicação do vírus da gripe. Também pode ser uma vacina trivalente ou quadrivalente e é de administração intramuscular.⁵⁰

6.2. Indicações para vacinar

A OMS recomenda a vacinação contra a gripe sazonal a indivíduos de risco elevado de complicações por gripe e também às pessoas que vivem ou cuidam de indivíduos pertencentes a esse grupo de risco (Tabela 6-1). Assim, a OMS recomenda que sejam vacinados grávidas (podem ser vacinadas em qualquer trimestre de gestação), crianças entre os 6 meses e os 5 anos, indivíduos portadores de doenças crônicas com idade superior a 6 meses, profissionais de saúde, idosos como também pessoas que viajam para os locais epidêmicos.^{2,55-58}

Tabela 6-1-Doenças ou condições de saúde para as quais está recomendada a vacina contra a gripe [Adaptado de (56)]

Doença ou condição de saúde	Exemplos
Respiratória	Asma que necessite de tratamento contínuo ou repetido com esteroides, Doença pulmonar obstrutiva crônica, bronquiectasias, fibrose quística, fibrose pulmonar intersticial, pneumoconiose, displasia broncopulmonar.
Cardíaca	Doença cardíaca congênita, hipertensão arterial com complicações cardíacas, insuficiência cardíaca crônica, doença isquêmica cardíaca.
Renal	Insuficiência renal crônica, síndrome nefrótica.
Hepática	Hepatite crônica, cirrose, atresia biliar.
Neuromuscular	Com comprometimento da função respiratória ou risco aumentado de aspiração de secreções.
Hematológica	Hemoglobinopatias.
Imunodepressora	Primária ou secundária a doenças ou tratamentos.
Obesidade	Índice de massa corporal igual ou superior a 30 kg/m ²
Transplante de órgãos sólidos ou medula	Indivíduos transplantados ou a aguardar transplante.
Diabetes <i>mellitus</i>	Tipo 1 e tipo 2.
Doença genética	Défice de alfa-1 antitripsina.
Outras	Crianças e adolescentes em tratamentos prolongados com salicilatos.

A partir dos 9 anos de idade, está recomendada 1 dose anual. Antes desta idade, crianças que nunca foram vacinadas contra a gripe devem receber 2 doses com um intervalo de 4 semanas entre as mesmas.^{55,49}

6.3. Efeitos Adversos e contraindicações

A administração de vacinas tanto inativadas como vivas atenuadas contra o vírus Influenza podem desencadear alguns efeitos indesejados em alguns indivíduos. Os efeitos adversos podem ser divididos em três categorias: reações locais ou sistêmicas de pequena gravidade, reações sistêmicas com possível recuperação após assistência médica e por fim, reações sistêmicas graves que podem comprometer o bem-estar e colocar a vida em risco.^{22,36,54}

Relativamente à vacina inativada, as reações no local das injeções (dor, vermelhidão e induração) são as mais frequentes, autolimitadas, desaparecendo ao fim de 1-2 dias e podem ocorrer em 15-20% dos vacinados. A ocorrência de febre, arrepios, mal-estar, ou mialgias é menos frequente, atingindo cerca de 1% dos vacinados e mostra-se mais frequente em indivíduos que não tiveram exposição anterior aos antígenos da vacina. Estes efeitos podem aparecer 6-12 horas após a toma da vacina, durando, tendo duração média de 1-2 dias. As reações alérgicas (urticária, asma alérgica, angioedema e choque anafilático) são raras, e provavelmente estão associadas a alergia a algum constituinte da vacina.^{50,59}

Por outro lado, na vacina viva atenuada as reações mais frequentes são semelhantes às de uma síndrome gripal (tosse, dores de cabeça, congestão nasal, dores de garganta), podendo ocorrer em até 40% dos adultos vacinados. Nas crianças dos 6 aos 24 meses, há um aumento do risco de ocorrência de pieira ou asma.^{50,59}

As contraindicações absolutas relativamente à toma da vacina são raras, contudo incluem casos de hipersensibilidade aos excipientes e à proteína do ovo, mesmo que seja em pequena quantidade, antecedentes de reação grave a uma dose anterior da vacina. Por outro lado, para a administração da vacina em indivíduos com doença aguda grave com ou sem febre, ou que esteja sob medicação frequente, é importante alertar o médico para se estimar o benefício/risco da sua administração. Nestes casos será prudente adiar a imunização do indivíduo para após recuperação.^{36,49,50}

Estas vacinas apesar de serem seguras e eficazes, apresentam limitações: como referido anteriormente, o *drift* antigénico permite o aparecimento de variantes virais que, por possuírem mutações na proteína H, escapam à capacidade neutralizante dos anticorpos induzidos pela vacinação. Em consequência, as vacinas não permitem uma resposta eficaz de longa duração, impondo uma constante atualização das preparações vacinais, de forma a mimetizar ao máximo os antígenos das variantes circulantes.⁴⁸

De modo a suprir esta lacuna, tem havido investigações para novas formas de vacinas, visando por um lado, a indução de anticorpos neutralizantes de largo espectro (isto é, capazes de reconhecer proteínas H de vários subtipos do vírus Influenza) e, por outro lado, a indução de uma resposta T citotóxica. Para alcançar este último objetivo, têm sido testadas vacinas baseadas nas proteínas M1, NP, PR8 e o uso da haste da H pois são antigénicamente mais conservados, permitindo que os anticorpos para eles criados reconheçam vários subtipos do vírus Influenza.^{60,61}

Assim, devido a todos os factos mencionados anteriormente, é importante criar alternativas para melhorar alguns aspetos que falham nas vacinas de administração intramuscular utilizadas em Portugal. Para melhorar o panorama atual, no início deste século iniciaram-se investigações com o objetivo de tornar o processo de imunização mais apelativo e, ao mesmo tempo de induzirem resposta imune local e sistémica mais duradoura e adequada. Para otimizar a eficácia da vacina é necessário a combinação de diversas estratégias como é o caso da escolha do local de administração, diferentes sistemas em entrega do antígeno ou ainda a adição de adjuvantes imunológicos.^{22,54,62-}

64

6.4. Estratégias em desenvolvimento

As vias de imunização são estratégias importantes, pois aumentam a imunogenicidade das vacinas no ato da entrega. A administração por vias mucosas têm apresentado resultados promissores, especialmente a administração via nasal, com

potencialidade para atingir os objetivos pretendidos, de que as vacinas convencionais ficam aquém.^{65,66}

6.4.1. Via de administração nasal

Apesar dos avanços recentes nas tecnologias de entrega, a vacina contra a gripe continua a ser principalmente administrada por via intramuscular como já foi referido anteriormente. Contudo, a utilização destas vacinas, ditas convencionais, gerou alguns inconvenientes e/ou relutância por parte da população, surgindo assim como alternativa promissora a administração por via nasal.^{67,68}

A imunização contra a gripe por via nasal é concordante com o local de infeção do vírus Influenza, considerando-se assim esta via uma forte candidata para a imunização contra este vírus. A vacinação através da via nasal tornou-se bastante atrativa oferecendo bastantes vantagens. Esta via de imunização não requer a utilização de agulhas, permitindo uma vacinação sem dor, potenciando uma maior recetividade à revacinação anual e também à minimalização da transmissão de doenças pela utilização destas. Contrariamente à vacinação parenteral, a vacinação por via nasal permite o aumento dos níveis séricos de IgG e de citocinas, como também o aumento da secreção de anticorpos IgA específico para o antigénio para a mucosa. Assim é possível desencadear uma resposta imunológica, quer a nível local, quer a nível sistémico, proporcionando um aumento significativo na eficiência da vacina contra a gripe. O facto de haver a indução de anticorpos IgA por esta via de administração, mostrou evidências na proteção contra vírus antigénicamente diferentes (Influenza A, Influenza B e Influenza C).^{36,65-68}

Para a vacinação por via nasal não é exigido esterilidade do produto a veicular, antissepsia do local de administração ou do operador, ou de pessoal especializado para a administração de vacinas, considerando-se assim uma via bastante menos dispendiosa comparativamente à intramuscular. Deste modo, a via nasal é propícia à autoadministração, sendo possível aplicar em países em desenvolvimento com condições precárias de saneamento ou em situações de catástrofes. Outra grande vantagem é o uso de uma menor quantidade de antigénio para produzir imunidade,

devido à pequena probabilidade de este ser clivado por proteases presentes nesta via.^{36,66,67,69}

No entanto, existem algumas limitações associadas à administração por via nasal que devem ser consideradas de modo a provocar uma resposta imune na mucosa e sistêmica aceitável. Como por exemplo, a rápida depuração mucociliar, a degradação proteolítica que ocorre a nível da mucosa nasal e o tamanho do antígeno são alguns fatores que levam à diminuição do tempo de permanência do antígeno dificultando a sua captação pelas células dendríticas da mucosa, comprometendo, eventualmente, a produção de uma resposta imune robusta.^{70,71}

Assim para o fabrico de uma vacina de administração por via nasal eficaz é fundamental manter o antígeno de forma estável na região da nasofaringe por tempo suficiente, para que este interaja com as células imunocompetentes do epitélio nasal com o intuito de estimular uma resposta imune sistêmica e da mucosa nasal contra o antígeno Influenza a longo prazo. Para amplificar estes resultados foram propostas estratégias, como a adição de adjuvantes imunológicos e de sistemas de entrega de antígenos, para a melhoria neste tipo de administração.^{66,72-74}

6.4.2. Adjuvantes imunológicos

O objetivo da vacinação é gerar uma resposta imunitária contra o antígeno administrado, capaz de proporcionar uma proteção a longo prazo. No entanto, a baixa imunogenicidade das vacinas é um grande obstáculo na indução de uma resposta rápida ao vírus.^{75,76}

Para combater tal adversidade, são utilizados adjuvantes, substâncias capazes de aumentar a imunogenicidade das vacinas, amplificar a resposta imune a um antígeno, aumentar a entrega e sua apresentação às APCs, bem como recrutar as células inflamatórias e imunocompetentes. Ao serem adicionados às vacinas, torna-se possível diminuir a carga de antígeno presente numa vacina e aumentar a eficácia da mesma, promovendo uma resposta imune adequada, especialmente em população idosa e imunocomprometidas.^{76,77}

A seleção de adjuvantes está relacionada com a via de administração, o tipo de imunidade requerida pela vacina e com probabilidade de efeitos adversos. Os adjuvantes mais utilizados têm capacidades solubilizante, tamponizante, conservante, humectante ou viscosificante. Para ser selecionado deverá ser estável, biodegradável, de baixo custo, incapaz de induzir respostas imunes contra si e promover uma resposta imune adequada. Atualmente, o alumínio é o adjuvante mais utilizado em vacinas adjuvadas, contudo não é o mais apropriado para combater patógenos intracelulares de doenças infecciosas. Desta forma tem-se apostado no desenvolvimento de novos adjuvantes tais como, emulsões sintéticas (óleo em água), formulações lipídicas, adjuvantes moleculares (citocinas e quimiocinas) ou substâncias naturais, e sua combinação, de modo a potencializar a indução de uma resposta imunitária. As novas formulações de adjuvantes ainda se encontram em testes clínicos, mostrando-se promissoras para contemplar as vacinas contra Influenza.^{65,71,77-79}

6.4.3. Sistemas de entrega de antígeno

A alternativa da vacinação pela via nasal levanta alguns obstáculos, como a diminuição da biodisponibilidade do antígeno e consequentemente a capacidade de induzir imunidade por parte deste, que podem ser facilmente solucionados através da utilização de sistemas de entrega de antígenos. Com o desenvolvimento de estudos nesta área, o processo de vacinação pela via nasal pode tornar-se mais eficiente e capaz de produzir em grandes quantidades vacinas utilizando apenas uma pequena quantidade de antígeno do vírus Influenza para qual a população é imune. Apesar destes sistemas incluírem estruturas da escala micrométrica e nanométrica, são preferidas as estruturas que utilizam a nanotecnologia como base pois têm um tamanho mais reduzido, uma grande área de superfície em relação ao seu volume, e uma alta taxa de difusão que possibilita maior tempo de contacto com as células epiteliais da mucosa, sendo menos suscetíveis ao seu arrastamento com o muco.^{66,80-83}

A aplicação de novas vacinas no combate a doenças infecciosas com sistemas de entrega de antígenos foi possível devido à descoberta de moléculas com capacidades agonistas dos TLR das células. A partir daí usaram-se diferentes materiais capazes de

mimetizar sinais de perigo ao sistema imunológico, desencadeando a capacidade de modular uma resposta imune.^{84,85}

Antes de projetar uma formulação de aplicação por vias mucosas é de extrema importância selecionar cuidadosamente os adjuvantes e os sistemas de entrega que as constituem, porque cada local de indução de imunidade tem os seus próprios requisitos. De seguida serão resumidos os critérios para a escolha e elaboração de formulações que utilizem sistemas de entrega de antígenos:^{65,66,78,86}

- Fabrico simples e económico;
- Reprodutível;
- Estável após a administração;
- Aplicável a um amplo conjunto de antígenos, proteínas e polinucleótidos;
- Não tóxico;
- De fácil armazenamento;
- Seguro.

7. Nanossistemas e a sua aplicação na veiculação de vacinas

A nanotecnologia é um campo científico multidisciplinar, em que na sua base encontram-se os nanossistemas, materiais de dimensões compreendidas entre 100 nm e 1 µm. A utilização de nanossistemas na área da nanomedicina permitem criar alternativas mais eficazes quer na prevenção, diagnóstico ou tratamento de diversas doenças.⁸⁷

O uso de nanotecnologia em imunização por mucosas tem mostrado grande evolução e interesse nos últimos 5 anos, especialmente pela capacidade de veicular antígenos em diferentes tipos de nanossistemas. O desenvolvimento de vacinas através desta estratégia permite a proteção do antígeno, uma maior eficiência no transporte do antígeno pela mucosa e posterior apresentação aos APCs. Para além disso, possibilita uma libertação do antígeno de forma mais controlada, a diminuição de toxicidade e da resistência às barreiras biológicas do corpo, como também, a capacidade de encapsular vários epítomos, possibilitando a existência de vacinas multivalentes.^{82,88-92}

No entanto, o número de ensaios clínicos utilizando nanossistemas para a formulação de vacinas para administração intranasal ainda é limitado. Esta limitação está associada principalmente à dificuldade de manter a integridade da nanovacina durante todo o processo de formulação. Todas as características dos nanossistemas mencionadas anteriormente e a capacidade de induzir de uma resposta imune apropriada são particularmente sensíveis às propriedades físico-químicas do próprio nanossistemas, dos ligantes, dos adjuvantes, das propriedades fisiológicas do meio e da potência do antígeno. Além disso, o mecanismo de interação dos nanossistemas com as células imunológicas, por vezes, parece pouco claro e precisa de ser melhor compreendido a nível molecular.^{93,68}

Diversos tipos de nanossistemas revelaram resultados promissores como sistemas de entrega de vacinas contra infeções por vírus respiratórios, particularmente contra o vírus influenza. Entre estes, nanopartículas (nanocápsulas e nanoesferas) poliméricas, nanopartículas lipídicas, lipossomas, micelas poliméricas, nanopartículas metálicas e dendrímeros (Figura 7-1). O material usado para formular os nanossistemas deve ser não reativo, biocompatível, estável e deve fornecer a permeabilidade necessária ao antígeno.^{82,90,68}

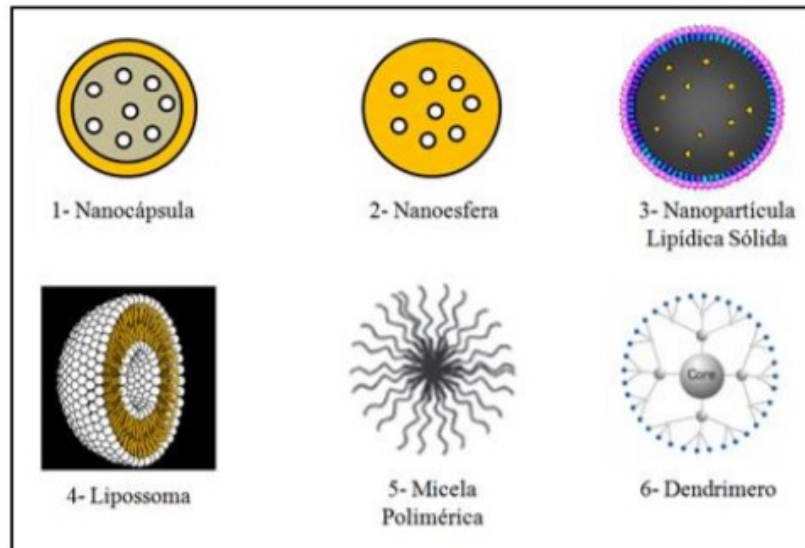


Figura 7-1- Diferentes tipos de nanossistemas [Adaptado de (90)]

De seguida serão apresentados os tipos de nanossistemas com exemplos de estudos relevantes para a entrega de vacinas contra o vírus Influenza.

7.1. Base polimérica

7.1.1. Nanopartículas

As nanopartículas poliméricas são estruturas coloidais cujas dimensões compreendem o intervalo entre 10 e 1000 nm, em que a sua composição e modos de preparação condicionam a dois tipos de estruturas diferentes, as nanocápsulas e nanoesferas (Figura 7-2). Estas nanopartículas poliméricas são distintas na sua organização estrutural que, conseqüentemente, condiciona o modo como veiculam os antígenos. Por um lado, as nanocápsulas constituem sistemas reservatórios onde é possível identificar um núcleo líquido diferenciado (de carácter oleoso ou aquoso) rodeado por uma membrana polimérica, na qual o antígeno pode encontrar-se dissolvido no núcleo, adsorvido na superfície. Por outro lado, nanoesferas são sistemas formados por matrizes poliméricas que não apresentam um núcleo diferenciado. Neste tipo de nanopartículas, os antígenos encontram-se frequentemente

distribuídos/encapsulados de forma homogênea no interior da matriz, sendo libertados por difusão.⁹⁴⁻⁹⁶

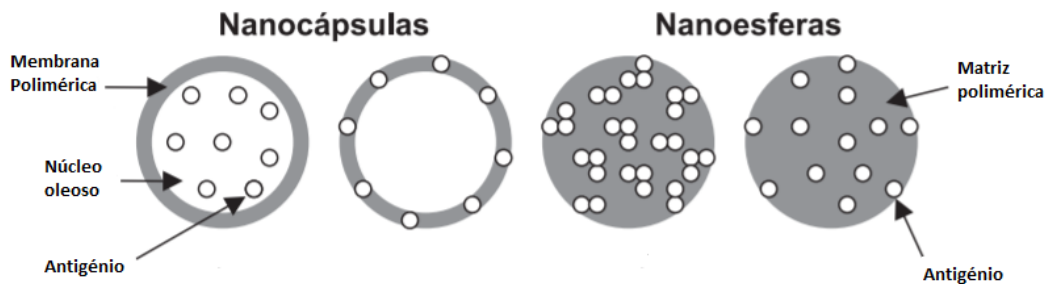


Figura 7-2- Representação esquemática de estruturas poliméricas, Nanocápsulas e Nanoesferas [Adaptado de (108)]

Atualmente, os sistemas poliméricos constituem excelentes opções de veiculação de antígenos, pois possibilitam uma libertação mais controlada do antígeno através da manipulação dos polímeros que as constituem, pela capacidade imunoestimuladora e de adesiva, permitindo o aumento de tempo em contacto com a mucosa. Deve haver uma seleção criteriosa do polímero a utilizar, considerando a sua biocompatibilidade, compatibilidade com o antígeno, velocidade de degradação e o custo de produção/obtenção do polímero. Atualmente, as nanopartículas com polímeros de origem natural são considerados os sistemas de eleição para a administração de vacinas em tamanho nanométrico, devido à flexibilidade e versatilidade desses biomateriais. Os polímeros de origem natural comparativamente aos de origem sintética ou semi-sintética, conferem elevada biocompatibilidade, fácil excreção do organismo sem apresentarem altos níveis de toxicidade. A produção de respostas imunológicas destas nanopartículas poliméricas pode ser potencializada pela adição de adjuvantes, todavia é necessário mais estudo para a evolução para ensaios clínicos.^{65,90,97-100}

Estudos sobre a imunização contra o vírus Influenza destacaram o uso de nanopartículas de diversos polímeros, quitosano, PLGA (do inglês, *lactic acid-co-glycolic acid*) e Y-PGA.^{65,97,101}

Quitosano

O quitosano é um polímero de origem natural, biodegradável e atóxico que tem sido bastante utilizado em sistemas para veicular antigénios/fármacos pela via nasal. Confere principalmente propriedade mucoadesiva, proporcionando um maior contacto entre a formulação e as células do epitélio. Para além disso, o quitosano possui a faculdade de quebrar as tight-junctions (complexos de multiproteínas que selam a via paracelular) de células do epitélio polarizadas, aumentando a acessibilidade das nanopartículas com o antigénio aos locais de indução de imunidade.¹⁰²⁻¹⁰⁴

Dabaghian *et al.* estudou em ratinhos a potencialidade das nanopartículas em induzir imunidade contra M2, candidato à vacina universal contra o vírus Influenza, por via nasal e a importância de ter um adjuvante. Durante este estudo não se utilizou nanopartículas de quitosano, devido ao facto de a pH fisiológico alterar a solubilidade e carga do quitosano. De modo a contornar tal problemática, usaram nanopartículas com polímero derivado do quitosano, N-trimetil quitosano (TMC), que é solúvel numa ampla gama de pH e tem uma carga mais positiva a pH neutro ou básico. O TMC consegue então superar todas as características do quitosano e ainda induzir a maturação das células dendríticas, melhorando a resposta imune inata.¹³² Adicionalmente, foi utilizada uma proteína de choque térmico 70 (HSP70c) como adjuvante capaz de potencializar a resposta citotóxica (produzir linfócitos T CD8+) e induzir INF- γ contra o antigénio. Desta forma, grupos de ratinhos sofreram imunização via nasal com r4M2e.HSP70c+ TMC, r4M2e.HSP70c, r4M2e+TMC, r4M2e livre e solução tampão PBS, em que posteriormente foram avaliadas as respostas imunes celulares e humorais específicas a este antigénio, e concludentemente a eficácia protetora contra a estirpe A/ PR/8/34 (H1N1). Os resultados *in vivo* mostraram que a administração de nanopartículas de r4M2e.HSP70c+TMC surtiram um aumento significativo no nível sérico de IgG, de IgA e de produção de citocinas (INF- γ e IL-4) comparativamente aos outros grupos. O aumento dos níveis de anticorpos e de produção de citocinas também foi notório após a infeção com o vírus Influenza, promovendo uma resposta imunitária mais eficiente e maior proteção contra o vírus (Figura 7-3).^{103,105}

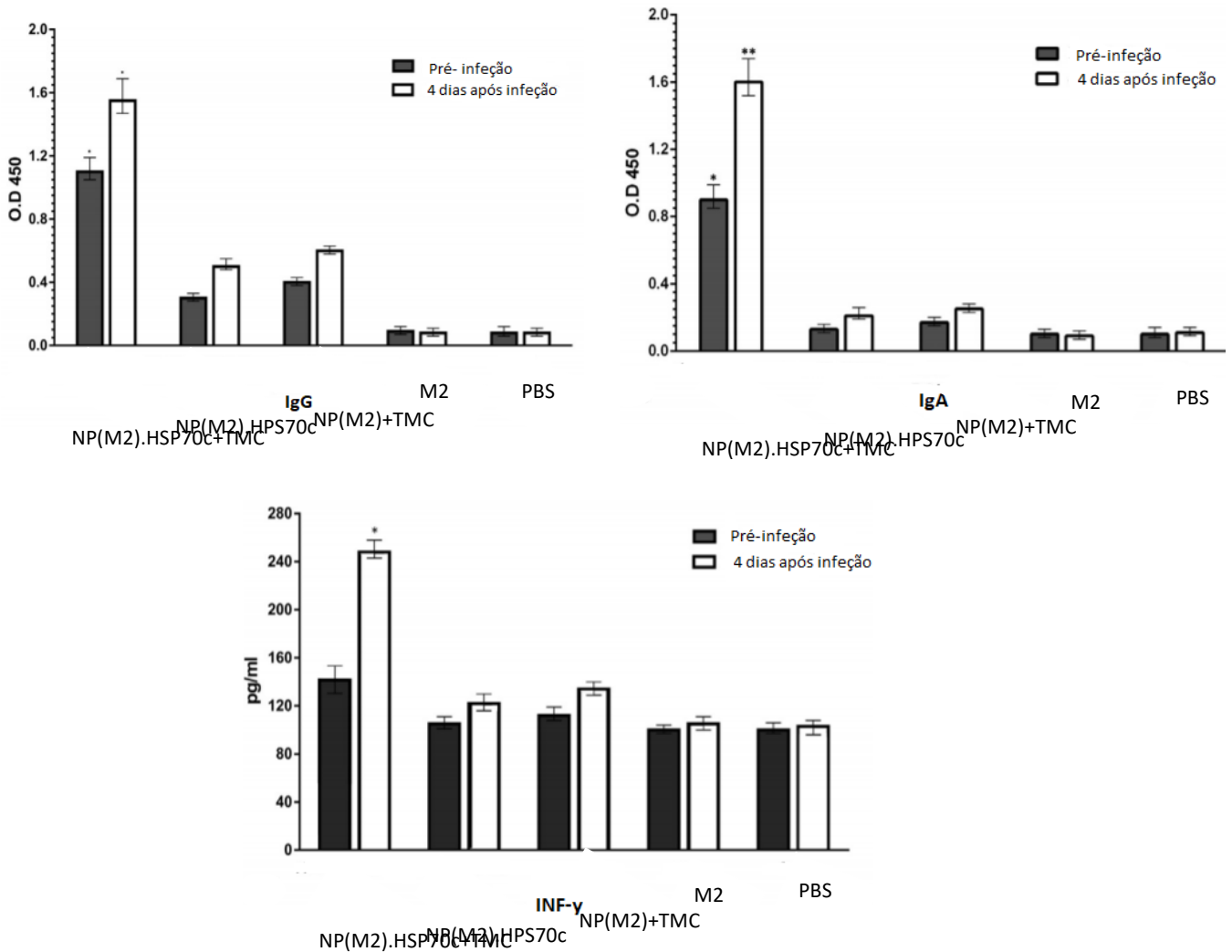


Figura 7-3- Determinação de (A) anti-M2 IgG (B) anti-M2 IgA (C) anti-M2 INF-γ no fluido bronco- alveolar (BALF) antes e 4 dias após a infecção de Influenza [Adaptado de (103)]

Neste estudo também foi possível verificar que em ambas as formulações com nanopartículas, r4M2e.HSP70+TMC e r4M2e+TMC, mostraram um perfil de liberação do antígeno bastante similar e aceitável, em que 65% da liberação do antígeno ocorreu nas primeiras 12 horas, seguido de uma liberação moderada perfazendo 93% após as 100 horas (Figura 7-4). Contudo, concluiu-se que a imunidade protetora efetiva contra o contra uma dose letal de 90% (LD90) do vírus Influenza A / PR / 8/34 (H1N1) foi conseguida apenas quando administraram em simultâneo, as nanopartículas de TMC e o adjuvante HPS70c. A administração nasal deste nanossistemas permitiu a indução de uma resposta imune contra M2, tanto celular como humoral, de longa duração e

também a capacidade de atenuar a infeção viral em comparação com os ratinhos vacinados com r4M2e.HSP70s livre por via intramuscular. Este facto é possível, pois o anticorpo IgA específico para a proteína M2 recentemente sintetizada nas células epiteliais, interferem na replicação intracelular ou na montagem do vírus, e portanto, aliviam a infeção viral.¹⁰³

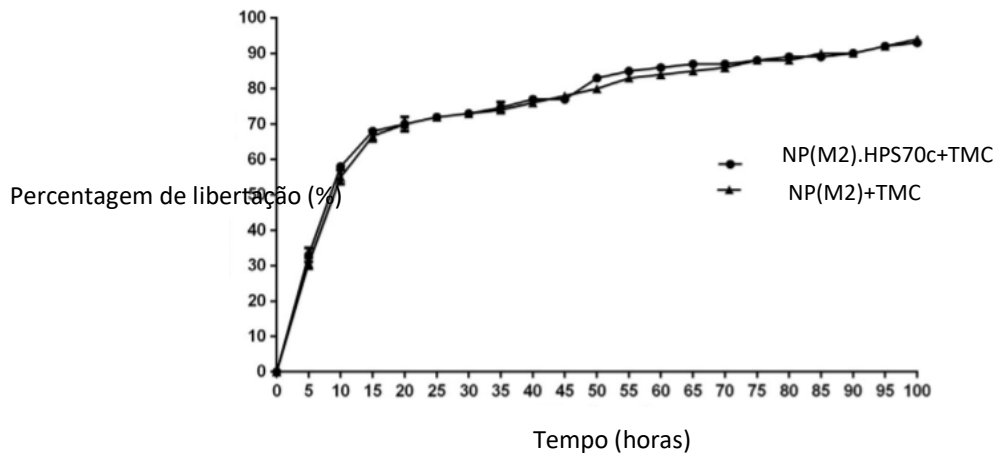


Figura 7-4-Perfil de libertação de antígeno em nanopartículas de TMC com e sem o adjuvante HPS70c [Adaptado de (103)]

Dhakar. et al. aplicou por via nasal as nanopartículas de quitosano (CNP) em suínos, com o objetivo de potencializar a resposta imune sistémica e a produção de anticorpos na mucosa, proporcionando uma melhor imunidade protetora nos porcos. Para isso, avaliaram as respostas imunes e a eficácia da proteção cruzada da vacina inativada com antígenos da estirpe H1N2, encapsulada em nanopartículas à base do polímero de quitosano (CNP-H1N2). Esta nanovacina foi administrada na quinta semana de idade de todos os leitões, vacinados ou do grupo de controlo, e o reforço na oitava semana de idade. Posteriormente na décima semana de idade, todos os leitões receberam 2 ml da estirpe virulenta H1N1 (linhagem γ). As amostras de sono foram retiradas nos dias 21 e 35 após a vacinação enquanto que as lavagens nasais foram recolhidas nos dias 0, 4 e 6 após terem sido expostos ao vírus Influenza H1N1. Os leitões que foram vacinados com CNP-H1N2 exibiram resposta na produção de anticorpos séricos IgG e a presença de anticorpos IgA secretados na mucosa em zaragatoas nasais. Antes da exposição dos leitões ao vírus Influenza H1N1, verificou-se um aumento da presença de linfócitos T

citotóxicos, na proliferação linfocitária específica ao antígeno e da secreção de IFN- γ nos leitões em que foram administrados CNPs-H1N2, em comparação com o grupo controle, administrado com a vacina solúvel. Os resultados desta experiência verificaram que os leitões vacinados com CNP-H1N2 apresentaram uma menor severidade, ao nível macroscópico e microscópico, em lesões do trato respiratório associadas ao vírus Influenza. É importante frisar que o índice infeccioso recolhidos nos dias 4 e 6 após o desafio foram significativamente reduzidos nos leitões em que foi administrado CNP-H1N2, contudo tais resultados não foram concordantes nem nos leitões em que foi administrada a vacina solúvel nem no grupo controle. Além disso, foi ainda observado um aumento na produção de células de memória e na secreção de IFN- γ nos linfonodos, mas acima de tudo, foi verificada uma forte resposta imunológica na mucosa, pela presença de anticorpos IgA, o que permitiu uma proteção cruzada no trato respiratório, resultando numa redução da propagação viral da cavidade nasal para as restantes cavidades do sistema respiratório dos porcos. Desta forma, os resultados deste estudo também defendem a utilização de nanopartículas de quitosano como sistema de veiculação de antígenos para produzir a vacina contra o vírus Influenza. A nanovacina da gripe à base de quitosano é considerada como candidata ideal para uso em suínos, considerando-se o porco como um potencial modelo animal para se prosseguir para os testes pré-clínicos.¹³³

Estudo clínico realizado por *Illum et al.* avaliaram em seres humanos a vacina nasal à base de nanopartículas de quitosano na dose de 7,5 μ g e 15 μ g de H. Grupos de 20 voluntários saudáveis foram imunizados duas vezes por via nasal, em que os resultados obtidos foram comparados com os de uma única imunização via intramuscular da vacina trivalente. O soro foi recolhido antes da primeira imunização, aos 26 dias após a primeira imunização e depois aos 28,56 e 98 dias após o reforço. A amostra da lavagem nasal foi recolhida antes da primeira imunização, aos 26 dias após a primeira imunização e depois aos 14, 28 e 98 dias após o reforço. Os resultados apresentados na tabela 7-1 indicaram que 40% dos indivíduos a que foi administrada a formulação por via nasal obteve um aumento bastante significativo nos valores relativos à inibição da hemaglutinação com a segunda imunização em comparação com os valores obtidos com apenas uma imunização. Estes mostraram-se idênticos para as três estirpes de Influenza indicando

que a vacina induz uma resposta imune eficaz. Quando administrado a mesma dosagem, ambas as vias de administração mostraram resposta eficaz contra o antigénio (valores superiores a 40), como também se obteve um número semelhante de voluntários (70%) que apresentaram níveis de proteção. Para além disso, os indivíduos mostraram tolerabilidade à formulação de nanopartículas de quitosano, considerando-se um candidato promissor à formulação de vacinas contra Influenza.¹⁰⁶

Tabela 7-1- Eficácia da formulação com nanopartículas de quitosano contra o vírus Influenza A/Sydney em estudo clínico em humanos [Adaptado de (106)]

Dias de estudo	Inibição da hemaglutinação eficaz contra A/Sydney (% de indivíduos responsivos)		
	Administração nasal de 7,5 µg de H	Administração nasal de 15 µg de H	Administração intramuscular de 15 µg de H
0	1ª imunização	1ª imunização	-
26	13	38	-
28	2ª imunização	2ª imunização	1ª imunização
56	17	52	65
84	26	57	59
126	22	57	62

PLGA

Paralelamente, a indução de imunidade e efetividade da entrega do antigénio vírus Influenza também foi testada em nanoesferas de PLGA por administração nasal em ratinhos. PLGA é um polímero sintético, biodegradável e biocompatível aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) e pela Agência Europeia do Medicamento (EMA) para o uso seguro em seres humanos. Devido às suas propriedades mucoadesivas, esta nanopartícula polimérica comprovou a eficácia no transporte do vírus Influenza. Deste modo, as nanopartículas de PLGA promovem uma maior eficiência na internalização do

antigénio pelas APCs, facilitando o processamento e a apresentação deste ao MALT.^{68,99,100,107}

No estudo de Maryam et al. avaliou-se a potencialidade das nanoesferas de PLGA a encapsular o antigénio do vírus Influenza, com a ajuda de co-adjuvantes, a saponina Quillaia ou o oligodesoxinucleiótido CpG. A produção destas nanopartículas tem como intuito o desenvolvimento de vacinas por via nasal. Neste estudo foram estudadas propriedades morfológicas e físico-químicas das nanoesferas a partir de métodos de microscopia eletrónica de varrimento (SEM), determinação do potencial zeta, a eficiência de encapsulação e o perfil de libertação. A Tabela 7-2 sumariza os resultados obtidos, onde é possível verificar um valor aproximado de -31 mV de potencial zeta, comprovando que a veiculação de antigénios por nanoesferas de PLGA é estável, podendo ser mantida em armazenamento por longos períodos de tempo. Estes dados também são indicativos de uma eficiente encapsulação do antigénio, conduzindo à produção de uma formulação adequada. Relativamente ao perfil de libertação dos compostos das nanoesferas de PLGA in vitro, foram libertados nos primeiros 90 minutos, 48% do antigénio, 44% do CpG e 35% da saponina Quillaia. Comparando os adjuvantes, o CpG mostrou um perfil de libertação mais elevado, tendo um papel mais significativo na indução da resposta imunológica humoral e celular, relativamente à saponina de Quillaia. Para além disso, o facto do seu perfil de libertação ser semelhante ao do próprio vírus Influenza, este é considerado o co-adjuvante mais adequado para a administração Figura 7-5. A libertação acentuada nos primeiros 90 minutos deve-se à possível clivagem da matriz da nanoesfera de PLGA, corroborando com o facto de que estas sofrem uma rápida metabolização.^{99,100,107}

Tabela 7-2- Resultados do potencial zeta e eficácia de encapsulação das diferentes nanoesferas de PLGA [Adaptado de (99)]

Nanoesferas de PLGA	Potencial zeta (mV)	Eficiência de encapsulação (%)
Contendo antigénio	-31±4	80,3±6,08
Contendo saponina Quillaia	ND	62,67±2,57
Contendo CpG	ND	31,55±1,38

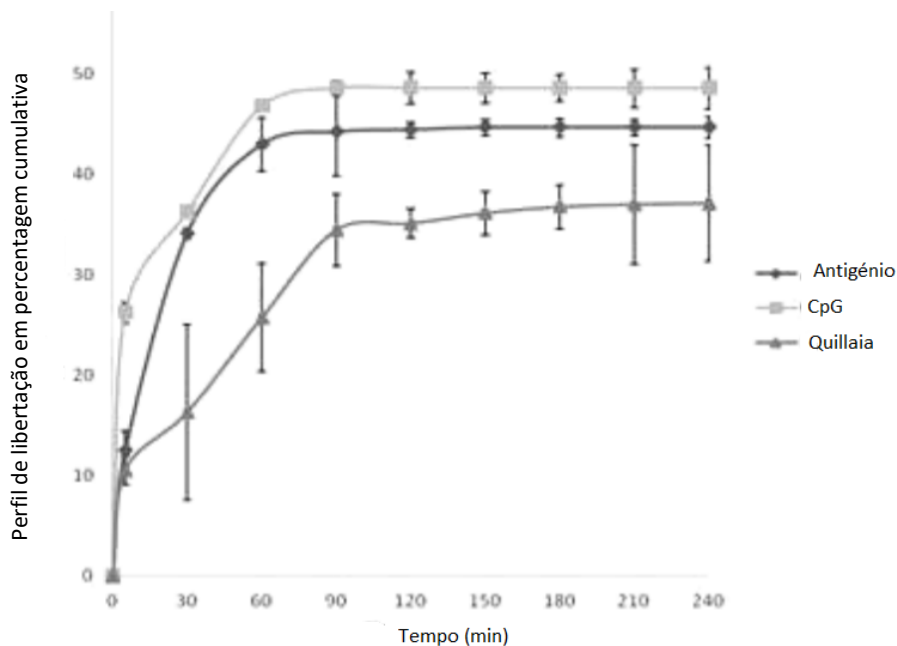


Figura 7-5- Perfil de libertação do antígeno do vírus Influenza, e dos adjuvntes CpG e Quillaia das nanoesferas de PLGA numa solução de PBS a 37°C in vitro [Adaptado de (99)]

Para melhorar a eficácia das nanopartículas de PLGA como sistema de entrega de antígeno, *Tamiru Negash et al.* submeteram as nanopartículas de PLGA a uma modificação de superfície. Numa das preparações revestiram as nanopartículas de PLGA com polímeros de quitosano, fornecendo um potencial de superfície positivo (+31 mV) às partículas, objetivando facilitar a interação destas com o muco pela maior permanência da formulação na superfície mucosa. O grupo das nanopartículas que não sofreram qualquer modificação na superfície apresentavam um diâmetro inferior, relativamente ao diâmetro de 819 nm das nanopartículas de PLGA revestidas com quitosano. Este estudo foi aplicado em galinhas, em que se administrou por via nasal antígenos do vírus influenza aviário (H4N6) encapsulados em dois tipos de formulações diferentes (NP_{PLGA}+CPG, quitosano-NP_{PLGA}). Estas formulações foram também comparadas com a administração nasal de vírus Influenza aviário inativado. Pelos resultados foi possível verificar que na quarta semana após a imunização, as induziram quitosano-NP_{PLGA} maior quantidade de anticorpos inibidores da hemaglutinação comparativamente às formulações NP_{PLGA}+CPG e à do vírus inativado (Figura 7-6A). A partir da terceira semana após a imunização, a formulação quitosano-NP_{PLGA} apresentou

maiores quantidades de anticorpos IgG séricos (O.D de 1,6) e de anticorpos IgA (O.D de 1,2) comparativamente aos outros dois grupos (Figura 7-6B e C).^{100,108,109}

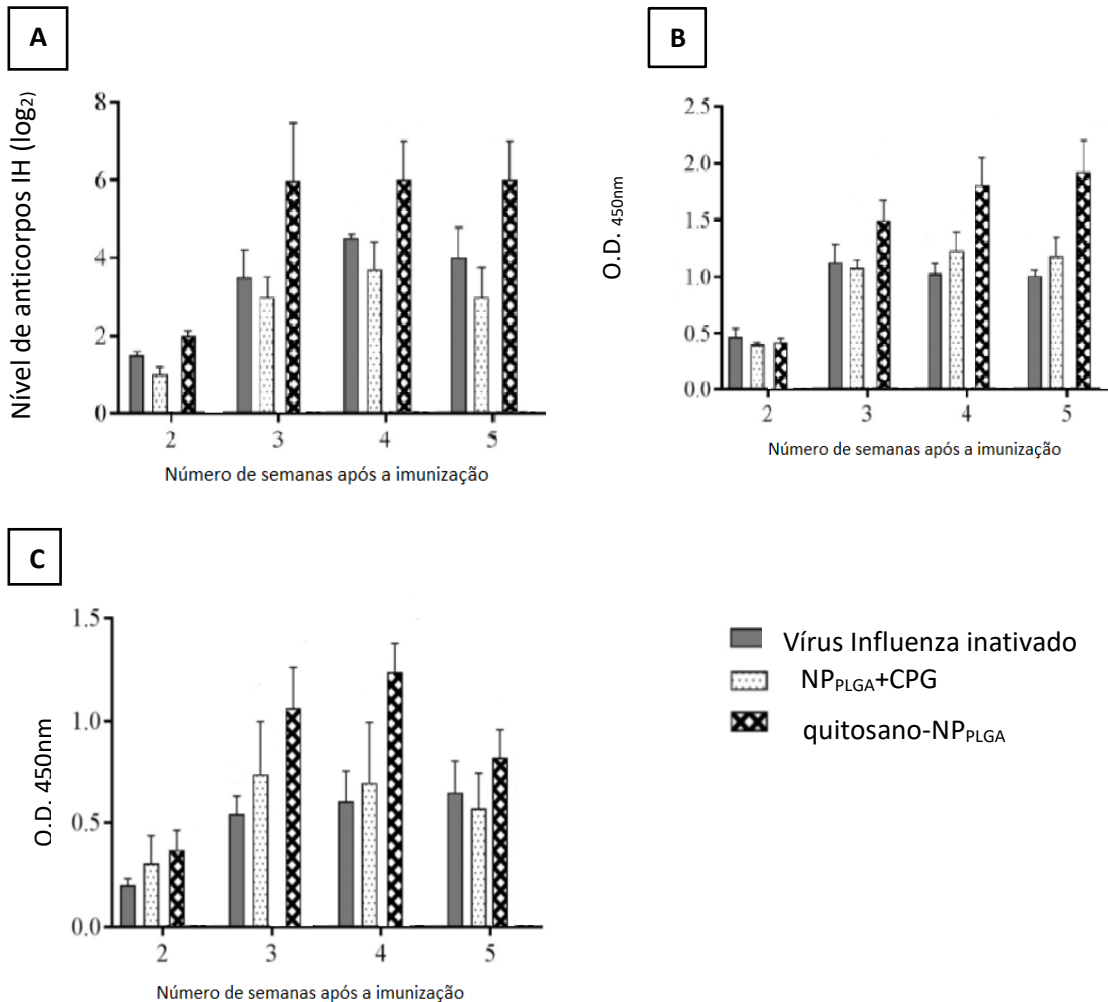


Figura 7-6- Representação dos níveis séricos de anticorpos IH (A), de IgG (B) e de IgA (C) induzidos por administração nasal de nanopartículas de PLGA encapsulando vírus Influenza aviário ou pela administração do vírus Influenza aviário inativado inteiro. [Adaptado de (100)]

Portanto, com base nos resultados apresentados, as galinhas foram capazes de induzir respostas mediadas por anticorpos tanto ao nível sistêmico como da mucosa, conferindo imunogenicidade ao antígeno de Influenza aviária encapsulado em nanopartículas de PLGA. Apesar das subclasses do anticorpo IgG não terem sido determinados nas galinhas, a aplicação de nanopartículas na administração nasal

potencializou a entrega do antígeno dos vírus Influenza. Contudo, ainda é necessário estudos que determinem se a quantidade de anticorpos produzida é suficiente para a proteção contra os vírus Influenza de origem aviária.^{99,100,107}

Em conclusão, todos os estudos apresentados com nanopartículas, sejam elas compostas por TMC ou de PLGA, indicaram que a indução de imunidade protetora contra o vírus Influenza foi resultado da cooperação entre nanopartículas poliméricas e de adjuvantes administrados, HSP70c, saponina Quillaia ou oligodesoxinucleótido CpG que conferem propriedades imunoesmulatorias às formulações.^{99,103}

7.1.2. Micelas

Por vezes, polímeros hidrófilicos quando estão presentes em água agregam-se de forma espontânea de modo a minimizar o contacto da parte hidrofóbica com esta. O tipo de forma que esta molécula se costuma agregar depende da sua estrutura inicial, da sua concentração assim como de outros fatores como a pressão e a temperatura. O processo de auto-rearranjo mais simples são as micelas, compostos estes formados por surfactantes (agentes ativos de superfície) quando a sua concentração está acima da concentração micelar crítica. A parte hidrofílica do surfactante fica em contacto com o solvente enquanto que a hidrofóbica fica no interior da micela. Este processo natural e espontâneo dos polímeros anfifílicos se agruparem permite o transporte de antígenos pouco solúveis em água no seu interior. As interações podem ser feitas a partir de ligações não específicas ou covalentes com o domínio hidrofóbico do polímero ou então, para moléculas hidrofílicas que possuem carga (como ácidos nucleicos, péptidos e proteínas) por meio de interações eletrostáticas com a carga oposta do polímero.^{108,110}

Young-Woock et al. utilizaram nanomicelas de 20 nm à base do polímero γ -PGA (do inglês, *gama-polyglutamic acid*), para obterem um sistema de entrega de antígeno mucoadesivo. Neste estudo o γ -PGA foi conjugado com grupos hidrofóbicos de colesterol, que ao sofrerem um auto-rearranjo formaram nanomicelas. Apesar do polímero γ -PGA ser aniónico, é a repulsão eletrostática entre os grupos funcionais do γ -

PGA (grupos carboxílicos), decorrente do pH 6,0 -6,5 da mucosa nasal, que torna mais suscetível a interação secundária dos grupos carboxílicos com as glicoproteínas da mucosa. Para além do carácter mucoadesivo dos grupos carboxílicos das nanomicelas de γ -PGA, a introdução de grupos amina a este nanossistemas induz uma interação mais forte com a camada celular epitelial de índole aniónica, resultando numa maior resistência dos antígenos na camada mucosa como também permitiram uma libertação prolongada e controlada dos antígenos à camada celular epitelial (Figura 7-7). Subsequentemente à adição dos grupos aminas, o potencial zeta das nanomicelas de γ -PGA sofreu uma alteração de -65,35 para 36,43 mV. ⁸³

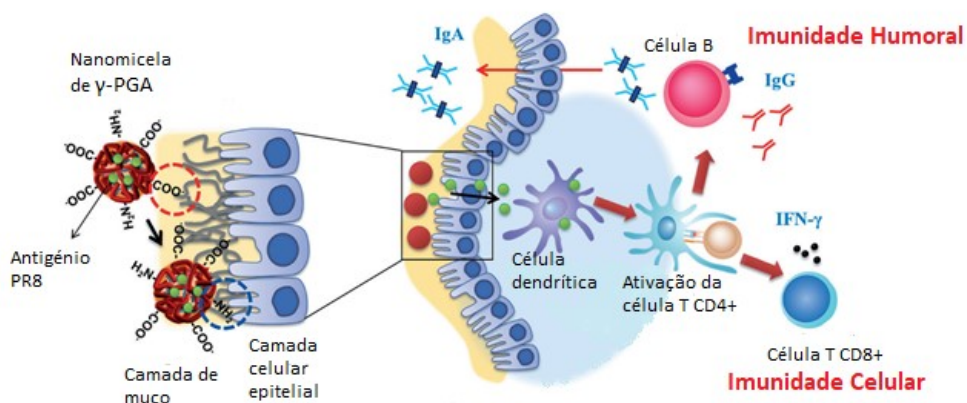


Figura 7-7- Imunização por mucosa baseada em micelas de polímeros. Os grupos carboxi podem atuar como um mucoadesivo na presença de glicoproteínas da camada de muco (círculo vermelho). Enquanto que as porções de amina podem interagir com a camada de células epiteliais de índole aniónica (círculo azul) [Adaptado de (83)]

Para testar a eficácia das nanomicelas de γ -PGA como sistema de transporte, os autores encapsularam o PR8, um antígeno do vírus Influenza inativado da estirpe A/PuertoRico/8/34 (H1N1). Esta formulação foi administrada por via nasal em ratinhos, em que os resultados foram comparados a ratinhos submetidos administração nasal do antígeno livre. Comprovou-se que nos ratos imunizados com as micelas foram induzidos altos níveis de IgG específico para o antígeno PR8 no soro, 28,6 vezes mais elevados que na formulação de PR8 livre, assim como níveis elevados de anticorpos IgA específicos para o antígeno PR8 presentes em lavagens nasais, 27,6 vezes superiores aos anticorpos encontrados nos ratos imunizados somente com o antígeno livre. Deste modo, os resultados sugerem que a co-entrega do antígeno PR8 através de nanomicelas γ -PGA

induziu uma resposta imune humoral abundante específica de PR8 (Figura 7-8A e B). A administração de nanomicelas também estimulou a secreção de IFN- γ e a inibição de hemaglutinação (bloqueio da capacidade do vírus em aglutinar glóbulos vermelhos com anticorpos específicos).⁸³

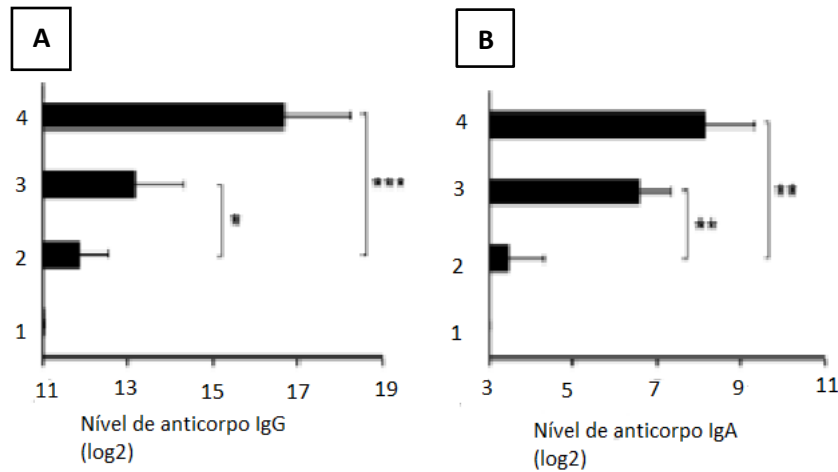


Figura 7-8- Resposta imune específica contra PR8 do vírus Influenza em ratinhos vacinados por via nasal com 1-PBS; 2- Antígeno PR8 isolado (20mg); 3- PR8 em nanomicela γ -PGA (10 mg); 4- PR8 em nanomicela γ -PGA (100 mg). O gráfico (A) corresponde aos valores relativos aos anticorpos IgG no soro e o gráfico (B) aos anticorpos IgA recolhidos da lavagem nasal [Adaptado de (83)]

Como os ratinhos imunizados com nanomicelas de γ -PGA demonstraram uma resposta imune celular e humoral robusta, os investigadores estudaram a imunidade protetora contra uma dose letal de infecção do vírus *Influenza A/PuertoRico/8/34* (H1N1). Resultados apresentados na Figura 7-9 comprovam que a imunização com este nanossistemas apresentaram uma taxa de sobrevivência de 100% durante o estudo, sem qualquer nível de toxicidade ou inflamação na mucosa nasal. Enquanto que os ratinhos imunizados apenas com o vírus PR8 apresentaram uma taxa de sobrevivência de 50% no dia 14 e perderam mais de 10% do seu peso corporal.⁸³

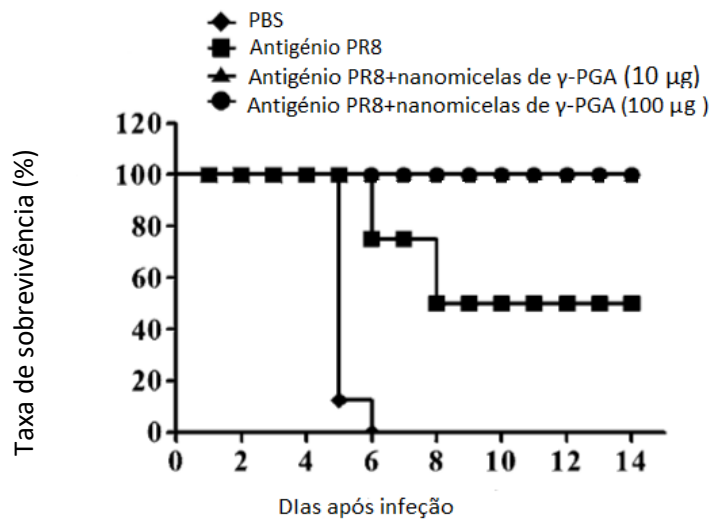


Figura 7-9- Taxa de sobrevivência dos ratinhos imunizados com diferentes formulações após exposição do vírus Influenza A/PuertoRico/8/34 (H1N1) [Adaptado (83)]

Embora os níveis de imunidade humoral e celular terem sido observados mais elevados na administração de 100mg de nanomicelas, bastou a administração de 10mg de nanomicelas de γ -PGA para aumentar a taxa de sobrevivência contra uma infecção letal. Os resultados descritos foram considerados significativos pois houve uma melhoria na resposta do anticorpo quando este não é muito imunogénico assim como a estimulação da resposta imune celular, que é igualmente importante na proteção contra agentes patogénicos. Desta forma, futuramente, as nanomicelas podem constituir futuras vacinas de administração nasal, em que é necessário obter uma vacina “em massa” ao qual a população é imune. Apesar de apresentarem estas vantagens, não existem muitos estudos na administração nasal destes sistemas, devido à possibilidade de destabilização por diluição em contacto com fluidos biológicos, o que pode resultar na libertação imediata do antígeno encapsulado.^{83,108,111}

7.2. Nanopartículas inorgânicas

As nanopartículas inorgânicas possuem uma estrutura não flexível de dimensões entre 5 a 40 nm, sendo vantajosos devido à sua maior eficácia terapêutica, biodistribuição e farmacocinética. Entre as nanopartículas inorgânicas, destacam-se

para a vacinação nasal as nanopartículas de ouro (AuNPs). As AuNPs são partículas inertes, não tóxicas, constituídas por uma parte central de átomos de ouro e por uma superfície que pode ser funcionalizada através da adição de grupos tiol, controlando a estabilidade e a solubilidade das partículas. Esta característica também permite que as AuNPs sejam reconhecidas por macrófagos e células dendríticas, induzindo a ativação imunológica.^{91,112,113}

Estudos desenvolvidos por Tao et al. consideraram a utilização de uma proteína integrante (M2) da superfície do vírus como alvo para a vacina contra o vírus Influenza. Como esta proteína se encontra em baixa concentração na superfície do vírus, apresenta uma baixa imunogenicidade, pelo que é necessário a utilização de nanopartículas para colmatar esta adversidade. Para garantir que toda a superfície da nanopartícula de ouro é coberta pelo antígeno, optaram por adicionar uma quantidade excessiva de M2 à formulação, estando parte do M2 imobilizado e outra parte solúvel (Figura 7-10). A quantidade de M2e que se encontra livre na formulação é um fator fulcral no aumento de anticorpos séricos IgG específicos anti-M2. O estudo sugere que as nanopartículas devem ter uma combinação na dose correta de antígeno solúvel e antígeno imobilizado, como é possível verificar na imagem seguinte.^{91,113,114}

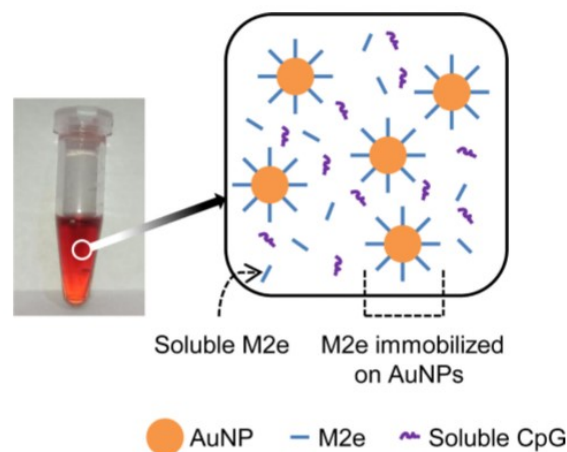


Figura 7-10- Esquema da formulação da vacina que tem três constituintes, M2, AuNP e o adjuvante CpG, dos quais o M2 está presente tanto na forma imobilizada como solúvel, ao contrário do adjuvante que apenas se encontra na forma solúvel. [Adaptado de (91)]

Nestes estudos testaram a resposta imunitária da vacina em ratos de modo a avaliar a longevidade e eficácia da imunidade gerada pela administração intranasal. As nanopartículas de ouro com a proteína M2 imobilizada conseguiu difundir-se nos gânglios linfáticos, desencadeando resposta imune a nível citotóxico como também na produção de anticorpos IgG anti M2 (com estimulação das subclasses IgG1 e IgG2a). Esta estratégia de imunização apresentou uma proteção durante oito meses contra a infeção pelas estirpes A/Califórnia/04/2009 (H1N1) pdm, A/Victoria/3/75 (H3N2) e A/ Vietman/ 1203/ 2004 (H5N1).^{91,113-115}

Determinou-se que nem o tamanho da partícula de ouro, nem a sua administração proporcionaram qualquer risco de segurança neste tipo de nanossistemas. Nomeadamente, os ratos não apresentaram sinais de doença, perda de peso ou pelo, inatividade ou rubor indicativo de possível inflamação. Contudo é necessário comprovar a biodisponibilidade destas partículas em humanos, estudos esses que se encontram em progresso.^{91,116,117}

Este estudo foi duplicado pelo mesmo autor, alterando o uso de nanopartículas de ouro para nanopartículas de sílica. Tal como os resultados obtidos no estudo com nanopartículas de ouro, verificou-se um aumento na indução de imunidade, contudo menos significativa. Isto deve-se ao facto das nanopartículas de sílicas serem menos eficazes na encapsulação comparativamente às nanopartícula de ouro, que apresentam uma taxa de absorção do antigénio M2e de 19,9% e 7,2%, respetivamente.^{91,92}

Um aspeto importante da produção destas formulações é a facilidade que os constituintes das nanopartículas de ouro, sílica têm de ser sintetizados e em grandes quantidades, o que possibilita uma adaptação continua da formulação de acordo com as mudanças antigénicas que o vírus Influenza sofre. No entanto, é fundamental o desenvolvimento de mais estudos, sobretudo a nível clínico, para estes sistemas serem considerados perfeitamente seguros pela via nasal. Permanece, no entanto, incógnito o seu mecanismo de ação, dados relativamente à sua biodegradação, vias de excreção e também níveis de toxicidade a longo prazo.^{92,112,118}

7.3. Partículas Vírus-Like

As nanopartículas virias também designadas por VLP (do inglês, *vírus-like particle*), são sistemas dinâmicos de automontagem, de 20- 100 nm de diâmetro, que apresentam repetições de proteínas funcionais na sua superfície sem qualquer carácter infeccioso. É importante ressaltar que estas proteínas funcionais são responsáveis pela capacidade de fagocitose pelas APCs, garantindo uma entrada eficiente nas células e, conseqüentemente, um direcionamento específico para NALT. As VLPs podem ser aplicadas em vacinação como sistemas de entrega de antígeno, capazes de interagir com o sistema imunológico, proporcionando respostas imunes potentes com um perfil de segurança adequado, constituindo assim uma alternativa segura para as vacinas de vírus inativados. Para além disso, estas estruturas são nanossistemas estáveis com a possibilidade de serem produzidas sinteticamente em grande quantidade num curto espaço de tempo (Figura 7-11). Estes nanossistemas são vantajosos relativamente aos nanossistemas sintéticos por causa da sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, sendo preferível a utilização de nanopartículas que derivam de vírus de plantas e bacteriófagos, dada a menor propensão de serem patogénicas em seres humanos e de desencadearem efeitos adversos.^{68,125-127}

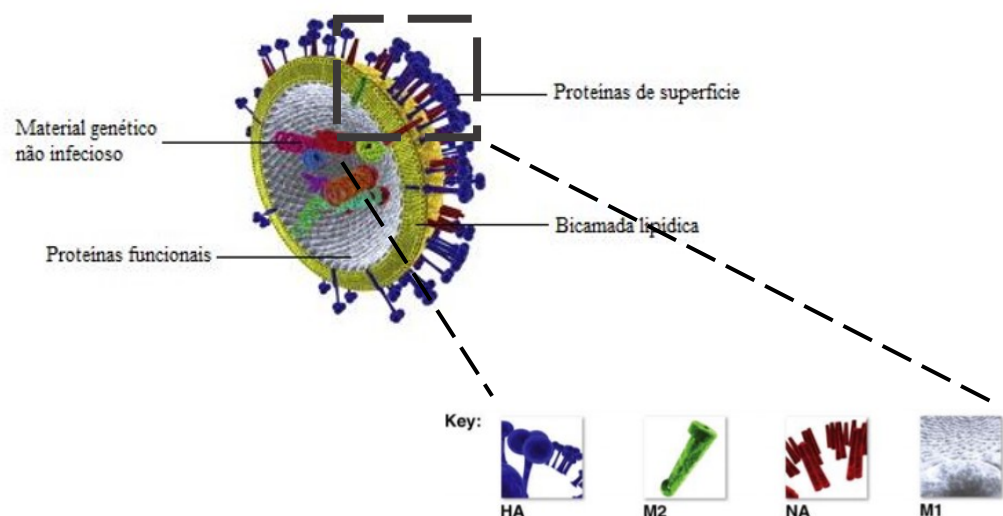


Figura 7-11- Estrutura e composição do VLP. As VLPs do vírus Influenza podem compreender até quatro proteínas estruturais H (azul), N (vermelho), M2 (verde) e M1 (cinzento) [Adaptado de (127)]

As VLPs, ao contrário dos nanossistemas anteriormente mencionados, não são formuladas por técnicas farmacêuticas, mas sim através de tecnologia recombinante *in vitro*. A produção destes nanossistemas têm como intuito o desenvolvimento de vacinas considerando a imprevisibilidade da evolução do vírus, oferecendo uma proteção para várias estirpes de Influenza.¹²⁵

Estudos de *Lee et al.* investigaram os efeitos protetores contra o vírus *Influenza* administrando VLPs com a proteína M2 na sua superfície (VLP M2e5x) por via intranasal em 10 ratinhos BALB. O processo de imunização durante esta experiência consistiu em dois momentos intervalados de 4 semanas. Resultados demonstraram baixos níveis de anticorpos específicos anti-M2 na primeira imunização, contudo estes níveis sofreram um aumento significativo depois da imunização ser reforçada (Figura 7-12A). A vacinação com M2e5x VLP resultou na produção de anticorpos IgG2a e IgG1, que sugerem a indução de respostas imunes celulares e humorais específicas anti-M2 (Figura 7-12B).¹²⁸

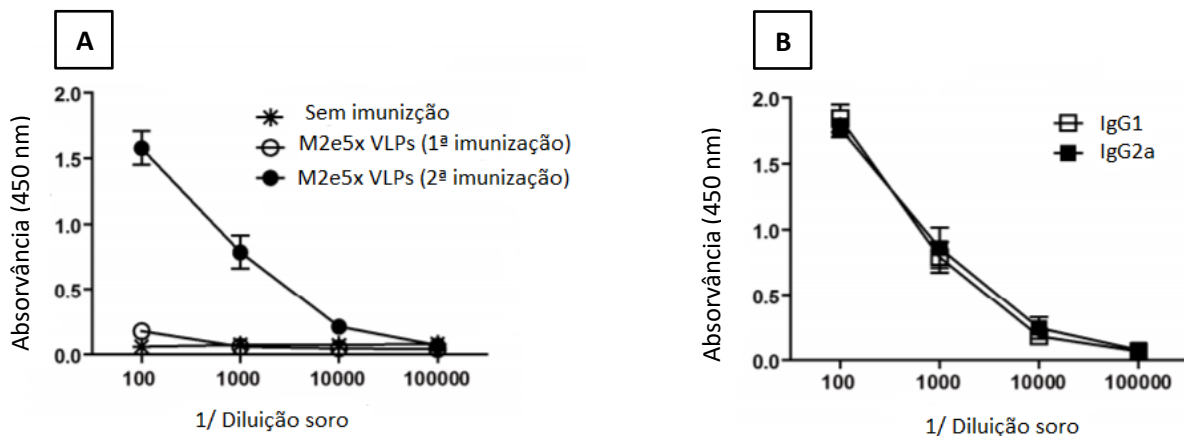


Figura 7-12--(A) IgG específico para M2. Os soros imunológicos foram diluídos em serie e os níveis de IgG contra o péptido M2 foram analisados por ELISA. (B) Isótipos de anticorpos IgG específicos para M2 foram determinados em ratinhos [Adaptado de (128)]

De seguida, os ratinhos vacinados com M2e5x VLP foram expostos ao vírus *Influenza* de estirpe A/Philippines/2/1982 ou A/ Vietman/ (rgH5N1) 6 semanas após o reforço. No terceiro dia após a exposição, a carga viral pulmonar nos ratinhos imunizados com M2e5x VLP revelaram uma diminuição de 14 vezes em comparação com os ratinhos não

imunizados. Este decréscimo tornou-se mais notório ao fim do sexto dia, onde a carga viral sofreu uma diminuição de 76 vezes nos ratinhos imunizados (Figura 7-13).^{128,129}

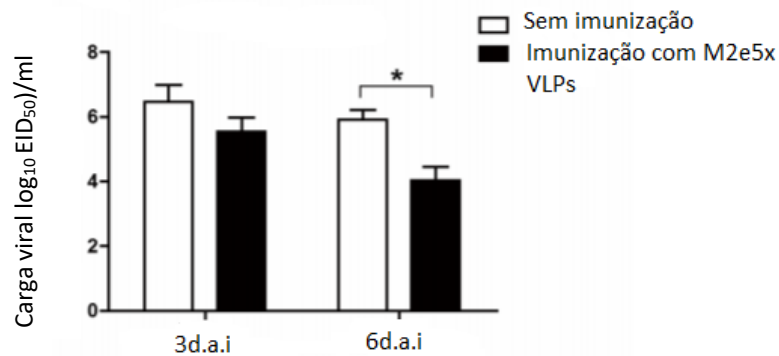


Figura 7-13- Carga viral pulmonar a 3 e 6 d.a.i (dias após a infeção) com a estirpe A/Vietnam/ (rgH5N1) 3 x a LD50 [Adaptado de (125)]

A utilização de VLPs como sistema de entrega de antígeno provocou a indução, tanto a nível da mucosa como sistémico, de anticorpos específicos para M2. Observou-se níveis elevados de anticorpos IgG e IgA nos ratinhos imunizados antes e após serem expostos aos vírus A/ Vietman/ (rgH5N1) (Fig 7-14A e B).¹²⁸

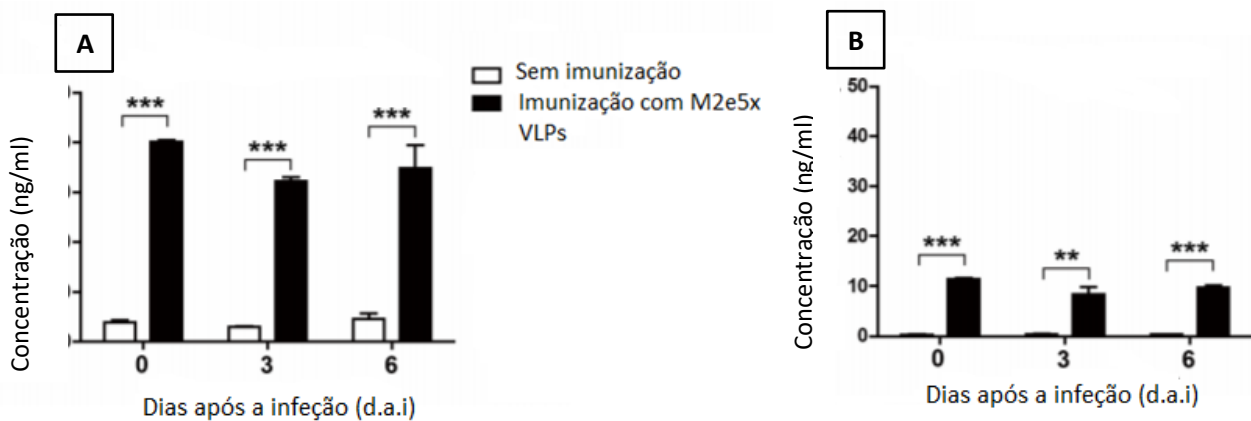


Figura 7-14- (A) Anticorpos IgG específicos para M2 no fluido broncoalveolar nos 0,3 e 6 dias após a infeção (B) Anticorpos IgA específicos para M2 nos 0, 3 e 6 dias após a infeção [Adaptado de (128)]

Do mesmo modo, *Mi et al.* utilizaram nanopartículas derivadas de *Escherichia coli* (rHF) que apresentam a proteína M2 na sua superfície para estudar a indução de respostas imunes na mucosa através da vacinação intranasal. Neste estudo comparou-se a indução de anticorpos específicos para M2 em ratinhos que se administrou PBS, 3M2e, nanopartículas rHF e nanopartículas de 3M2e-rHF. Os anticorpos foram recolhidos de lavagens nasais, quatro semanas após a imunização final e quatro dias depois de os ratinhos serem expostos a A/PR/8, e posteriormente submetidos a ELISA (teste imunoenzimático que permite a deteção de anticorpos específicos). Verificaram-se níveis de IgA e IgG na mucosa nasal do grupo de ratinhos imunizados com 3M2e-rHF, pré e pós-infeção, significativamente maiores que nos restantes grupos (Figura 7-15A e B). Assim, estes resultados sugerem que a vacinação intranasal com nanopartículas de 3M2e-rHF induz fortes respostas imunes na mucosa. Adicionalmente neste estudo, os efeitos imunológicos e a eficácia protetora das nanopartículas 3M2e-rHF foram avaliadas através de diferentes vias de administração, intramuscular e intranasal. Como é possível verificar na Figura 7-15C, os níveis séricos dos anticorpos IgG específicos para M2 induzidos por via intramuscular foram igualmente elevados aos níveis alcançados pela administração intranasal. Contudo a eficácia protetora das nanopartículas de 3M2e-rHF administradas por via intramuscular revelou-se significativamente mais fraca devido ao fraco poder indutivo de anticorpos IgA na mucosa nasal.¹³⁰

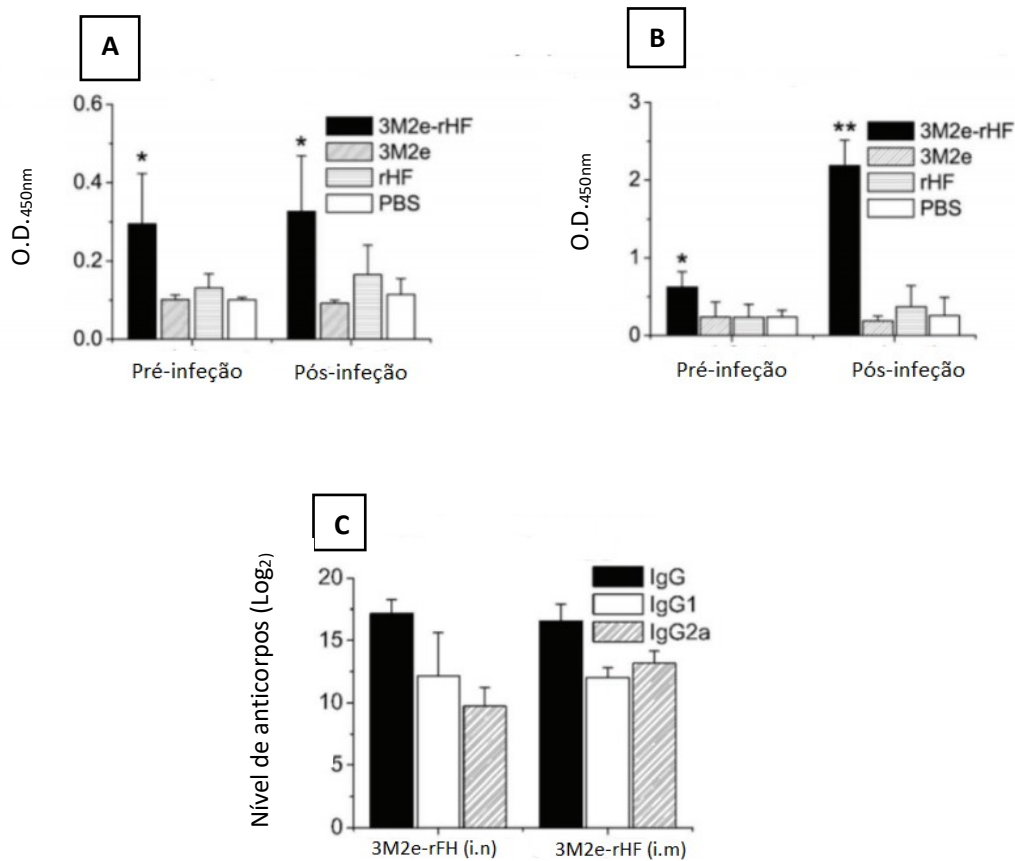


Figura 7-15- Comparação da produção de anticorpos IgG e IgA entre diferentes formulações e vias de administração (A) Indução do anticorpo IgA específico para M2 pelos sistemas 3M2e-rHF, 3M2e, rHF e PBS. (B) Indução do anticorpo IgG específico para M2 pelos sistemas 3M2e-rHF, 3M2e, rHF e PBS. (C) Indução de Anticorpos IgG e suas subclasses (IgG1 e IgG2a) pelo sistema 3M2e-rHF administrado pela via nasal (n) e intramuscular (i.m) [Adaptado de (130)]

Resultados obtidos dos estudos de *Lee et al.*, *Mi et al.* e *Min-Chul et al.* mostraram que a vacinação por via intranasal com VLPs de 3M2e-rHF e M2e5x-VLP induz a produção de anticorpos IgG e IgA específicos para M2, tanto na mucosa como a nível sistêmico. Para além disso, verificaram que os anticorpos IgA induzidos têm a capacidade de se ligarem às proteínas M2 do vírus que sofreram mutações (Figura 7-16). Estes resultados sugerem que a administração dos nanossistemas em questão por via intranasal conferem proteção cruzada eficaz contra diversos subtipos do vírus Influenza.^{125,130,131}

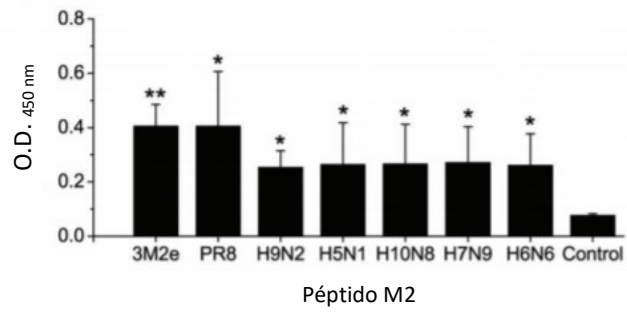


Figura 7-16- Teste de ligação entre o anticorpo IgA presente nas lavagens nasais dos ratinhos imunizados com 3M2e-rFH pela via intranasal com os péptidos M2 de diversos subtipos do vírus Influenza [Adaptado de (130)]

7.4. Limitações

Embora os estudos descritos anteriormente apresentem resultados promissores para novas formulações de vacinas contra a gripe, existe alguma falta de conhecimento e preocupação por parte da comunidade científica. Primeiramente é destacado o manuseamento difícil e complexo dos materiais de escala nanométrica, devido às forças e interações que podem ocorrer e afetar a utilidade dos produtos, a possível ausência de compatibilidade desses biomateriais, assim como aplicação difícil dos métodos de produção de nanossistemas à escala industrial.¹³⁷

Por vezes, a performance dos nanossistemas administrados pela via nasal encontra-se condicionada, apresentando baixa capacidade de atravessar a membrana da mucosa, uma rápida depuração dos tecidos da cavidade nasal e uma falta de variedade de adjuvantes compatíveis com o organismo humano.⁶⁶ O tempo de permanência da formulação no organismo tem que ser suficiente para permitir a biodisponibilidade do antígeno e conseqüentemente, uma maior eficácia terapêutica, contudo não pode ser excessivo, pois a acumulação de níveis tóxicos de nanomateriais pode provocar conseqüências à saúde a longo prazo. Importa salientar que os efeitos tóxicos podem estar associados aos nanomateriais, podendo não apresentar nenhuma manifestação, ao contrário do que ocorre na generalidade dos efeitos tóxicos causados por macro materiais. Alguns investigadores concluíram que a utilização de nanomateriais na vacinação contra o vírus Influenza pode causar danos mitocondriais, aumento ou diminuição da agregação plaquetária, ou até alterações cardiovasculares.^{138,139}

Apesar de haver uma grande variedade de compostos que podem ser utilizados na preparação destes sistemas de veiculação de antígeno, é necessária uma seleção criteriosa. É fundamental eleger a formulação que proporciona a melhor resposta imunológica possível aos antígenos e adjuvantes, uma vez que esta eleição é influenciada pelas próprias características do sistema, a estabilidade do antígeno encapsulado, a toxicidade no organismo, como também, pela técnica e custo de produção dos nanossistemas comparado com as vacinas convencionais. Deste modo, a escolha do material do nanossistemas que vai encapsular o antígeno é um dos principais fatores de preocupação na sua administração pela mucosa nasal, impactando a eficácia

clínica. Geralmente, as partículas devem ser produzidas a partir de materiais não reativos, biocompatíveis, estável e capaz de encapsular com eficiência uma quantidade exata de antigénio que potencie a imunização contra a gripe pela cavidade nasal.^{34,119,140}

O número reduzido de ensaios clínicos realizados ou em curso resulta da dificuldade em controlar a reprodutibilidade da vacina e respetivo sistema transportador, bem como, da falta de estabilidade durante as etapas de produção e armazenamento. Para além destes inconvenientes, a escolha do modelo animal mais adequado para os estudos pré-clínicos em humanos também foi referida como obstáculo ao sucesso da imunização por via nasal contra a gripe em humanos. É importante que o animal utilizado tenha vias aéreas similares aos humanos, fator essencial para uma melhor avaliação da eficácia e segurança dos sistemas de transporte de antigénio, para a previsão da dose ideal para a administração por via nasal e de modo a facilitar a previsão do desenvolvimento de alergias ou doenças respiratórias.^{141,142}

Para que estes estudos sejam efetuados em seres humanos, a relação risco- benefício tem de ser favorável para o sujeito, antes de ser ponderada para a sociedade em geral. Para minimizar o risco do paciente são tomadas algumas precauções, como a utilização de um modelo humano somente quando a pergunta e o objetivo do estudo não se consigam solucionar em modelos animais ou em técnicas *in vivo*, assim como, deve ser facultada terapia antiviral disponível no mercado, oseltamivir ou peramivir, caso o participante desenvolva infeção grave contra o vírus Influenza durante o desafio experimental. Para que o desafio experimental em humanos contra Influenza se mantenha com integridade ética e possa ser implementado, devem ser tomados em consideração os critérios descritos na tabela seguinte (Tabela 7-3).^{146,147}

Tabela 7-3- Considerações éticas no desenho de um modelo de vacina para o combate do vírus Influenza (Adaptado de (147))

Considerações éticas no desenho de um modelo de uma vacina para o combate do vírus Influenza

- Seleção da estirpe e dose apropriada do antigénio de Influenza para alcançar a doença de modo leve ou moderado;
- Critérios de inclusão e exclusão de participantes saudáveis com comorbilidades mínimas;
- Revisão completa do estudo proposto por uma comissão de ética;
- Seleção de parâmetros clínicos e microbiológicos adequados para minimizar o risco para os participantes;
- Realização de provas de diminuição da infecciosidade (vírus detetável por testes moleculares) após a alta do participante para eliminar as possibilidades de este transmitir o vírus à população em geral;
- Acompanhamento clínico e avaliação adequada quando ocorrem efeitos adversos decorrentes da infeção pelo vírus Influenza;
- Instalações e equipas treinadas para garantir a monitorização cuidadosa dos participantes;
- Assinatura e compreensão do consentimento informado por parte do participante e uma compensação justa.

Uma limitação da utilização do modelo humano é o requisito de ter voluntários saudáveis sem comorbidades significativas. Como mencionado acima, devem ser recrutados voluntários saudáveis, a fim de reduzir o risco geral e as complicações para o indivíduo. No entanto, torna-se uma limitação à compreensão da patogénese do vírus Influenza e do desempenho da vacina em populações de alto risco que têm maior probabilidade de contrair infeções graves, como os muito jovens e idosos, imunocomprometidos e aqueles com comorbidades. Outra limitação inerente a este modelo é o objetivo, produzir apenas uma infeção leve a moderada do vírus, e não doença grave. Pelo que, a eficácia de novas vacinas deveria ser testada na população que sofre de doenças graves, contudo tal não é possível por razões éticas.¹⁴⁷

No entanto, apesar dos artigos apresentarem resultados promissores, é também necessário ter em conta que os resultados são baseados em modelos experimentais *in vitro* ou *in vivo* em modelos animais e que por vezes existem variações nas condições em que se realizam os ensaios (métodos de preparação, materiais de diversas origens, polímeros e antigénios com diferentes propriedades), pelo que a extrapolação destes resultados para modelos humanos deve ser feita com o rigor que a investigação exige. De fato, a aplicação clínica de nanossistemas nesta área ainda se encontra numa fase de desenvolvimento inicial, onde a compreensão da interação entre nanossistemas e processos biológicos é crucial para o desenvolvimento de formulações eficazes que garantam perfil farmacocinético, farmacodinâmico e de segurança adequado. Desta forma urge a necessidade de realizar ensaios com voluntários humanos para validar a eficácia desta tecnologia, e ao mesmo tempo tentar padronizar os protocolos experimentais. Estes protocolos experimentais têm que ter em consideração os custos das matérias-primas e técnicas a utilizar, pois ao serem demasiado elevados, tornam-se formulações bastante dispendiosas e conseqüentemente inacessíveis à maioria da população.^{139,141-143}

Adicionalmente, tal como acontece com outros produtos farmacêuticos que contêm nanossistemas, estes também devem ser submetidos a uma regulamentação adequada para que haja segurança nos procedimentos efetuados, e conseqüentemente, obter resultados clínicos confiáveis. Questões de segurança e de ambientalismo tem ganho mais atenção em virtude do aumento da investigação de nanossistemas para esta finalidade, pelo que é imperativo a contínua investigação em nanossistemas, para que sejam aceites como método alternativo de vacinas de aplicação nasal contra o vírus Influenza, e posteriormente licenciamento para uso humano.^{137,141,143-145}

8. Conclusão

A vacinação contra Influenza é a estratégia mais eficaz e segura de proteção do indivíduo e conseqüentemente de uma epidemia na comunidade. Por isso é fundamental a continuação de investigações alternativas que melhorem a intensidade e a duração da imunização contra as imprevisibilidades antigénicas do vírus.

Como o sistema respiratório é a via de invasão principal deste agente patogénico, a comunidade científica considerou prudente e fulcral a geração tanto de uma imunidade local como a imunidade sistémica. Além disso, a imunização por mucosas, neste caso a via nasal, pode representar uma alternativa promissora para as vacinas de administração intramuscular, por ser uma via menos invasiva e conseqüentemente de mais fácil adesão por parte da população. Várias vantagens favorecem a utilização desta via, como por exemplo, a alta vascularização da cavidade nasal e a capacidade de a mucosa nasal responder a antígenos, através da presença de células imunocompetentes, células M e dendríticas.

Para reforçar da imunização por esta via, considerou-se a utilização de nanossistemas como sistemas de transporte de antígenos por apresentar o tamanho adequado para este tipo de administração. Estudos revelaram que o uso de nanossistemas é uma estratégia interessante para o desenvolvimento de vacinas contra *Influenza*, pois protege o antígeno da sua degradação por fatores físico-químicos da mucosa nasal e controla o processo da sua libertação. Destaca-se esta última característica por ser a maneira mais eficiente de apresentar os antígenos às APCs para desenvolvimento de uma resposta imune protetora à posterior. As propriedades dos nanossistemas podem ser potenciadas com a utilização de polímeros e/ou adjuvantes, que por serem moléculas com propriedades mucoadesivas aumentam a capacidade de retenção dos nanossistemas na mucosa nasal.

Outra grande vantagem é a capacidade de encapsular múltiplos epítomos do antígeno num só veículo, abrindo a possibilidade para a criação de vacinas multivalentes e o possível desenvolvimento de uma vacina universal contra a gripe de proteção ampla.

É de realçar, por sua vez a falta de investigações meticolosas na aplicação de nanossistemas por via nasal em diversas áreas (segurança, toxicologia, económicas) visando a produção de vacinas não apenas eficazes, seguras, mas também baixos custos de produção e aplicação. É necessário o desenvolvimento e financiamento de mais investigações utilizando nanossistemas por via nasal para formular vacinas contra Influenza totalmente eficazes e seguras, isto porque, apenas um pequeno número de estudos está em desenvolvimento inicial.

Nos próximos anos esperamos alcançar um maior número de resultados satisfatórios para que se consiga iniciar ensaios clínicos, utilizando nanossistemas para aplicação nasal, na vacina contra Influenza. Futuramente, a nanovacinação poderá vir a ser aplicada como estratégia de prevenção de epidemias no combate do vírus *Influenza* em países subdesenvolvidos ou em vias de desenvolvimento que, geralmente e previsivelmente, apresentam baixos recursos económicos e uma elevada taxa de mortalidade para doenças infecto-contagiosas. Esta estratégia de prevenção deverá ser operacionalizada através da implementação de programas de vacinação, recorrendo ao conhecimento emergente e tecnologias facilitadoras.

Bibliografia

1. Pechirra P, Cristóvão P, Costa I, et al. *Programa Nacional de Vigilância Da Gripe: Relatório Da Época 2017/2018 [Online]*. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP; 2018.
2. *Direção-Geral de Saúde. Norma 018/2018- Vacinação Contra a Gripe. Época 2018/2019;* 2018.
3. Toledo Jr AC de C. *Histórias de Doenças Infecciosas*. 1ª Edition. (Maltez F, Almeida AR de, eds.). Follium; 2014.
4. Abrahams J, Besselaar T, Brett-Major D. *Pandemic Influenza Risk Management [Online].;* 2017. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259893/WHO-WHE-IHM-GIP-2017.1-eng.pdf?sequence=1>. Accessed January 20, 2019.
5. Sobral JM, Lima ML. *A Epidemia Da Pneumónica Em Portugal No Seu Tempo Histórico [Online].;* 2018. <http://journals.openedition.org/lerhistoria/4036%0ALer> Accessed March 18, 2019.
6. Spreuwenberg P, Kroneman M, Paget J. Reassessing the Global Mortality Burden of the 1918 Influenza Pandemic. *American Journal of Epidemiology*. 2018;187(12):2561-2567.
7. Frada J. *Gripe Pneumónica Em Portugal Continental-1918*. Sete Camin.; 2005.
8. David JA. Surtos epidémicos ocorridos em Portugal na primeira metade do século XX : abordagem histórico-epidemiológica . *Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna*. 2012;19(2):46-66.
9. Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza : The Mother of All Pandemics. *Emerging Infectious Diseases*. 2006;12(1):15-22.
10. George F. Introdução ao estudo da gripe [Online]. Direção Geral de Saúde. <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/introducao-ao-estudo-da-gripe-pdf.aspx>. Published 2014. Accessed January 22, 2019.
11. Jorge R. *Boletim de Vigilância Epidemiológica Da Gripe*. Lisboa; 2019. www.insa.pt Published January 2019. Accessed February 6, 2019.
12. Weekly epidemiological record. World Health Organisation. <http://www.who.int/wer>. Published 2012.
13. *Global Influenza Strategy 2019–2030*. Geneva: World Health Organization; 2019.
14. Roguski KM, Chang HH, Palekar R, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *The Lancet*. 2018;1285-1300. doi:10.1016/S0140-6736(17)33293-2
15. *WHO Preferred Product Characteristics for Influenza Vaccines*. Geneva: World Health Organization; 2017.
16. Garcia A, Correia A, Diniz A. Plano de Contingencia Nacional do Sector da Saude para a Pandemia de gripe. [Online]. Direção Geral de Saúde. <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/plano-de-contingencia-nacional-do-sector-da-saude-para-a-pandemia-de-gripe-pdf.aspx>. Published 2007. Accessed April 15, 2019.
17. World Health Organization. A revision of system of nomenclature for influenza viruses [Online]. World Health Organization.

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2395936/pdf/bullwho00427-0070>.
Published 1980. Accessed February 9, 2019.
18. Calder LJ, Wasilewski S, Berriman JA, Rosenthal PB. Structural organization of a filamentous influenza A virus. *PNAS*. 2010;107:10685-10690. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1002123107. Accessed August 13, 2019.
 19. Oxford J, Kellam P. *Human Virology 5th Ed*. New York: Oxford University Press Inc.; 2011.
 20. World Health Organization. *Avian Influenza: Assessing the Pandemic Threat [Online]*; 2005.
<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Avian+influenza:+assessing+the+pandemic+threat#0>.
 21. Tadeu L, Figueiredo M. Pneumonias virais. aspectos epidemiológicos, clínicos, fisiopatológicos e tratamento. 2009;35(9):899-906.
 22. Owen J, Punt J, Strandford S. *Kuby Immunology*. 7ª Edition.; 2013.
 23. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*. 2009;459(18):931-939.
 24. Nicholls JM, Chan MCW, Chan WY, et al. Tropism of avian influenza A (H5N1) in the upper and lower respiratory tract. *Nature medicine*. 2007;13(2):147-149.
 25. Barry JM. *The Great Influenza: The Story of the Deadliest Pandemic in History*. Revised ed. Penguin Group; 2005.
 26. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk H. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *Journal of Virology*. 2004;78:12665-12667.
 27. Cohen M, Zhang X, Senaati HP, et al. Influenza A penetrates host mucus by cleaving sialic acids with neuraminidase. *Virology Journal*. 2013;10:1-13.
 28. Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nature medicine*. 2005;11:45-53. doi:10.1038/nm1213
 29. Gregory AE, Titball R, Williamson D. Vaccine delivery using nanoparticles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2013;3(1):1-13.
 30. Darrell J. Irvine, Melissa C. Hanson, Kavya Rakhra and TT. Synthetic Nanoparticles for Vaccines and Immunotherapy. *Chemical Reviews*. 2016;150(2):137-143.
 31. Washington N, Steele RJC, Jackson SJ, et al. Determination of baseline human nasal pH and the effect of intranasally administered buffers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000;198(2):139-146.
 32. Bagan J, Paderni C, Termine N, et al. Mucoadhesive Polymers for Oral Transmucosal Drug Delivery: A Review. *Current Pharmaceutical Design*. 2012;18(34):5497-5514.
 33. Witt E, Schmidtman E. Sistema Imunitário- Parte I: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*. 2010;50(4):434-461.
 34. Chadwick S, Kriegel C, Amiji M. Nanotechnology solutions for mucosal immunization. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010;62(4):394-407.
 35. Lamichhane A, Azegami T, Kiyono H. The mucosal immune system for vaccine

- development. *Vaccine*. 2014;32(49):6711-6723.
36. Nowlan M. *The Immunisation Advisory Centre: Influenza [Online].*; 2017. <https://www.immune.org.nz/diseases/influenza>. Accessed June 22, 2019.
 37. Fan Y, Sahdev P, Ochyl LJ, J. Akerberg J, Moon JJ. Cationic liposome-hyaluronic acid hybrid nanoparticles for intranasal vaccination with subunit antigens. *Journal of Controlled Release*. 2015;208:121-129.
 38. Preetly S, Lukasz O, James M. Biomaterials for Nanoparticle vaccine delivery systems. *Bone*. 2014;31(10):1-7.
 39. Perrone LA, Plowden JK, García-Sastre A, Katz JM, Tumpey TM. H5N1 and 1918 Pandemic Influenza Virus Infection Results in Early and Excessive Infiltration of Macrophages and Neutrophils in the Lungs of Mice. *PLoS Pathog*. 2008;4(8):1000115.
 40. Junior D, Araújo J, Catelan T. Sistema Imunitário-Parte II: Fundamentos da resposta imunologica mediada por linfocitos T e B. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*. 2014;50(5):367-370.
 41. Mckinstry KK, Strutt TM, Kuang Y, et al. Memory CD4 + T cells protect against influenza through multiple synergizing mechanisms. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012;122:2847-2856.
 42. Mckinstry KK, Strutt TM, Swain SL. Hallmarks of CD4 T cell immunity against influenza. *J Intern Med*. 2011;269:507-518.
 43. Kreijtz JHCM, De Mutsert G, Van Baalen CA, Fouchier RAM, Osterhaus ADME, Rimmelzwaan GF. Cross-Recognition of Avian H5N1 Influenza Virus by Human Cytotoxic T-Lymphocyte Populations Directed to Human Influenza A Virus. *Journal of Virology*. 2008;82(11):5161-5166.
 44. Martinez O, Tsibane T, Basler CF. Neutralizing anti-influenza virus monoclonal antibodies: Therapeutics and tools for discovery. *International Reviews of Immunology*. 2009;28(1-2):69-92.
 45. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 8ª Edition.; 2015.
 46. Abbas AK, Janeway CA. *Immunology: Improving on Nature Review in the Twenty-First Century Notion at the Time, One That Challenged Existing Concepts of How Proteins Conformed to the Shapes of Other Inter-Acting Proteins. Nevertheless, the Clonal Selection The*. Vol 100.; 2000.
 47. Acip IP, Rutledge TF, Boyd MF, Starr TM. Prevention and Control of Influenza with Vaccines. 2010;59.
 48. Tate MD, Job ER, Deng Y-M, Gunalan V, Maurer-Stroh S, Reading PC. Playing Hide and Seek: How Glycosylation of the Influenza Virus Hemagglutinin Can Modulate the Immune Response to Infection. *Viruses*. 2014;6:1294-1316.
 49. Redfield RR, Kenzie WR Mac, Kent CK, et al. Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices- United States, 2018-19 Influenza Season. *Centers for Disease Control and Prevention [Online]*. 2018;67(3):1-20. <https://www.cdc.gov/vaccines/acip>. Accessed November 9, 2019.
 50. CDC- Centers for Disease Control and Prevention. *Immunology and Vaccine-Preventable Diseases.*; 2015.

51. World Health Organization. WHO/Europe influenza surveillance. World Health Organization. WHO/Europe influenza surveillance. Available at: <http://www.euroflu.org/>16. Esposito S, Cantarutti L, Molteni CG, Daleno C, Aof clinical illness and viral shedding and household index.php. Accessed March 13, 2019.
52. World Health Organization. *Recommended Composition of Influenza Virus Vaccines for Use in the 2019- 2020 Northern Hemisphere Influenza Season [Online].*; 2019.
53. World Health Organization. *A (H3N2) Component of the Recommended Composition of Influenza Virus Vaccines for Use in the Northern Hemisphere 2019-20 Influenza Season and Development of Candidate Vaccine Viruses for Pandemic Preparedness.*; 2019.
54. Grohskopf LA, Sokolow LZ, Broder KR, Walter EB, Fry AM, Jernigan DB. Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices—United States, 2018–19 Influenza Season. *MMWR Recommendations and Reports*. 2018;67(3):1-20.
55. Vaccines and Immunizations. Centers for Disease Control and Prevention [Online]. <http://www.cdc.gov/vaccines/>. Published 2019. Accessed September 3, 2019.
56. World Health Organization (WHO). Vaccines against influenza WHO position paper. *Weekly epidemiological record*. 2012;87:461-476.
57. Filipe CS. Adesão à vacina contra a gripe: Motivações dos enfermeiros. Ciências da Saúde- Universidade Católica Portuguesa. 2012.
58. Noh YW, Hong JH, Shim SM, et al. Polymer nanomicelles for efficient mucus delivery and antigen-specific high mucosal immunity. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2013;52(30):7684-7689. doi:10.1002/anie.201302881
59. Halsey NA, Talaat KR, Greenbaum A, et al. The safety of influenza vaccines in children: An Institute for Vaccine Safety white paper. *Vaccine*. 2015;33(2015):F1-F67.
60. Rimmelzwaan GF, Fouchier RA, Osterhaus AD. Influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes: a correlate of protection and a basis for vaccine development. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007;18(6):529-536.
61. Steel J, Lowen AC, Wang TT, et al. Influenza Virus Vaccine Based on the Conserved Hemagglutinin Stalk Domain. *MBio*. 2010;1:1-9.
62. Bardiya N, Bae J. Influenza vaccines: recent advances in production technologies. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005;67:299-305.
63. Kemble G, Greenberg H. Novel generations of influenza vaccines. *Vaccine*. 2003;21:1789-1795.
64. Manini I, Maria C, Id T, Lazzeri G, Rossi S, Montomoli E. Egg-Independent Influenza Vaccines and Vaccine Candidates. *Vaccine*. 2017:1-8.
65. Singh M, Briones M, O'Hagan DT. A novel bioadhesive intranasal delivery system for inactivated influenza vaccines. *Journal of Controlled Release*. 2001;70(3):267-276. doi:10.1016/S0168-3659(00)00330-8
66. Zaman M, Chandrudu S. Strategies for intranasal delivery of vaccines. 2013:100-109. doi:10.1007/s13346-012-0085-z
67. Illum L. Nasal drug delivery - Possibilities, problems and solutions. In: *Journal of Controlled Release*. Vol 87. ; 2003:187-198.

68. Albrecht RA, Bourgault S, Archambault D, Al-Halifa S, Gauthier L, Arpin D. Nanoparticle-Based Vaccines Against Respiratory Viruses. *Frontiers in Immunology* / www.frontiersin.org. 2019;1:22. www.frontiersin.org. Accessed November 11, 2019.
69. Kiyono H, Fukuyama S. Nalt-versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4(9):699-710.
70. Fortuna A, Alves G, Serralheiro A, Sousa J, Falcão A. Intranasal delivery of systemic-acting drugs: small-molecules and biomacromolecules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2014;88:8-27.
71. Mosafer J, Sabbaghi AH, Badiie A, Dehghan S, Tafaghodi M. Preparation, characterization and in vivo evaluation of alginate-coated chitosan and trimethylchitosan nanoparticles loaded with PR8 influenza virus for nasal immunization. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;14(2):216-221. doi:10.1016/j.ajps.2018.04.005
72. Köping-Höggård M, Sánchez A, Alonso MJ. Nanoparticles as carriers for nasal vaccine delivery. *Expert Review of Vaccines*. 2005;4(2):185-196. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14760584.4.2.185>. Accessed October 19, 2019.
73. Mangal S, Pawar D, Garg NK, et al. Pharmaceutical and immunological evaluation of mucoadhesive nanoparticles based delivery system(s) administered intranasally. *Vaccine*. 2011;29(31):4953-4962. doi:10.1016/j.vaccine.2011.04.112
74. Jabbal-Gill I. Nasal vaccine innovation. *Journal of Drug Targeting*. 2010;18(10):771-786.
75. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunology and Cell Biology*. 2004;82(5):488-496.
76. Lee Y-T, Kim K-H, Ko E-J, et al. New vaccines against influenza virus. *Clinical and Experimental Vaccine Research*. 2014;3:12-28. doi:10.7774/cevr.2014.3.1.12
77. Lambert LC, Fauci AS. Influenza Vaccines for the Future. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(21):2036-2044. doi:10.1056/NEJMra1002842
78. Sharma PK, Garg G, Salim M. Review on nasal drug delivery system with recent advancement. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2011;3:6-11.
79. World Health Organization. Influenza vaccine- observed rate of vaccine reactions. World Health Organization [Online].2012. https://www.who.int/vaccine_safety/initiative/tools/Influenza_Vaccine_rates_information_sheet.pdf. Accessed June 19, 2019.
80. Macchione M. Métodos de estudo do transporte mucociliar Methods for Studying Mucociliary Transport. 2007;73(5):704-712.
81. Samarão R. Novos sistemas terapêuticos para administração nasal de fármacos. Universidade Fernando Pessoa. 2015.
82. Mody N, Sharma R, Agrawal U, Vyas SP. Nanocarriers: A versatile approach for mucosal vaccine delivery. *Therapeutic Delivery*. 2015;6(2):231-245.
83. Noh YW, Hong JH, Shim SM, et al. Polymer nanomicelles for efficient mucus delivery and antigen-specific high mucosal immunity. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2013;52(30):7684-7689. doi:10.1002/anie.201302881

84. De Koker S, Lambrecht BN, Willart MA, et al. Designing polymeric particles for antigen delivery. *Chemical Society Reviews*. 2011;40(1):320-339.
85. Basith S, Manavalan B, Lee G, Kim SG, Choi S. Toll-like receptor modulators: A patent review (2006 - 2010). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2011;21(6):927-944.
86. Sailaja A, Amareshwar P, Chakravarty P. Chitosan nanoparticles as a drug delivery system. *Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2010;1(3).
87. Rossi B. A nanotecnologia: da saúde além do determinismo tecnológico. *Ciência e Cultura*. 2017;60(2):1-5.
88. Gregory A, Titball R, Williamson D. Vaccine delivery using nanoparticles. *Cellular and Infection Microbiology*. 2013;3(13).
89. Gutjahr A. Biodegradable Polymeric Nanoparticles-Based Vaccine Adjuvants for Lymph Nodes Targeting. *Vaccines*. 2016;4:1-16.
90. RAWAT M, SINGH D, SARAF S. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. *Pharmaceutical Biology*. 2016;29(9):1790-1798.
91. Tao W, Gill HS. M2e-immobilized gold nanoparticles as influenza A vaccine: Role of soluble M2e and longevity of protection. *Vaccine*. 2015;33(20):2307-2315.
92. Wibowo N, Chuan YP, Seth A, Cordoba Y, Lua LHL, Middelberg APJ. Co-administration of non-carrier nanoparticles boosts antigen immune response without requiring protein conjugation. *Vaccine*. 2014;32(29):3664-3669.
93. Bachmann MF, Jennings GT. Vaccine delivery: A matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10(11):787-796.
94. Mainardes RM, Cristina M, Urban C, et al. Liposomes and Micro / Nanoparticles as Colloidal Carriers for Nasal Drug Delivery. *Current Drug Delivery*. 2006;3:275-285.
95. Svilenov H, Tzachev C. Solid Lipid Nanoparticles – A Promising Drug Delivery System. In: Press OC, ed. *Nanomedicine*. ; 2014:187-237.
96. Letchford K, Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007;65(3):259-269.
97. des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider YJ, Pr eat V. Nanoparticles as potential delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *Journal of Controlled Release*. 2006;116(1):1-27.
98. Selva Nandakumar K, Shakya A. Polymers as immunological adjuvants: An update on recent developments Antibody induced arthritis View project Autoimmunity View project. *Journal of BioScience and Biotechnology*. 2012;1(3):199-210.
99. Mohajer M, Khameneh B. Preparation and characterization of PLGA nanospheres loaded with inactivated influenza virus, CpG-ODN and Quillaja saponin. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2014.
100. Alkie T, Yitbarek A. Characterization of immunogenicity of avian influenza antigens encapsulated in PLGA nanoparticles following mucosal and subcutaneous delivery in chickens. *PLOS*. 2018;13(11).
101. Sl tter B, Bal S, Keijzer C, et al. Nasal vaccination with N-trimethyl chitosan and PLGA

- based nanoparticles: Nanoparticle characteristics determine quality and strength of the antibody response in mice against the encapsulated antigen. *Vaccine*. 2010;28(38):6282-6291.
102. Amin M, Jaafari MR, Tafaghodi M. Impact of chitosan coating of anionic liposomes on clearance rate, mucosal and systemic immune responses following nasal administration in rabbits. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009;74(1):225-229.
 103. Dabaghian M, Latifi AM, Tebianian M, NajmiNejad H, Ebrahimi SM. Nasal vaccination with r4M2e.HSP70c antigen encapsulated into N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticulate systems: Preparation and immunogenicity in a mouse model. *Vaccine*. 2018;36(20):2886-2895. doi:10.1016/j.vaccine.2018.02.072
 104. Dhakal S, Renu S, Ghimire S, et al. Mucosal immunity and Protective efficacy of intranasal inactivated influenza Vaccine is improved by chitosan nanoparticle Delivery in Pigs. *Frontiers in Immunology*. 2018;9(934):1. doi:10.3389/fimmu.2018.00934
 105. Khameneh B, Momen-Nejad M, Tafaghodi M. *In Vivo Evaluation of Mucoadhesive Properties of Nanoliposomal Formulations upon Coating with Trimethylchitosan Polymer Nanoliposomes Coated with TMC*. Vol 1.; 2014. <http://nmj.mums.ac.ir>. Accessed December 3, 2019.
 106. Illum L, Hinchcliffe M, Fisher AN, Davis SS. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. 2001;51:81-96.
 107. Souto E, Severino P, Santana M. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados. *Polímeros*. 2012;22:101-106.
 108. Schaffazick S, Guterres S, Freitas L, Pohlmann A. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para a administração de fármacos. *Química Nova*. 2003;26(5):726-737.
 109. Alkie TN, Taha-Abdelaziz K, Barjesteh N, Bavananthasivam J, Hodgins DC, Sharif S. Characterization of innate responses induced by PLGA encapsulated- and soluble TLR ligands in vitro and in vivo in chickens. *PLoS ONE*. 2017;12(1):e0169154. doi:10.1371/journal.pone.0169154
 110. Caban S, Aytakin E, Sahin A, Capan Y. Nanosystems for drug delivery. *Design & Delivery*. 2015;2(1):2.
 111. Luo Z, Shi S, Jin L, et al. Cationic micelle based vaccine induced potent humoral immune response through enhancing antigen uptake and formation of germinal center. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015;135:556-564.
 112. Kalkanidis M, Pietersz GA, Xiang SD, et al. Methods for nano-particle based vaccine formulation and evaluation of their immunogenicity. *Methods*. 2006;40(1):20-29.
 113. Tao W, Ziemer KS, Gill HS. Gold nanoparticle-M2e conjugate coformulated with CpG induces protective immunity against influenza A virus. *Nanomedicine (Lond)*. 2014;9(2):237-251. doi:10.2217/nnm.13.58
 114. Ingrole RS, Tao W, Tripathy JN, Gill HS. Synthesis and Immunogenicity Assessment of Elastin-Like Polypeptide-M2e Construct as an Influenza Antigen. *Nano LIFE*. 2014;4(2):1450004.
 115. Tao W, Hurst B, Shakya AK, et al. Consensus M2e peptide conjugated to gold nanoparticles confers protection against H1N1, H3N2 and H5N1 influenza A viruses HHS

- Public Access. *Antiviral Res.* 2017;141:62-72. doi:10.1016/j.antiviral.2017.01.021
116. Lasagna-Reeves C, Gonzalez-Romero D, Barria MA, et al. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2010;393(4):649-655.
 117. Khlebtsov N, Dykman L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: A review of in vitro and in vivo studies. *Chemical Society Reviews.* 2011;40(3):1647-1671.
 118. Shakya AK, Chowdhury MYE, Tao W, Gill HS. Mucosal Vaccine Delivery: Current State and a Pediatric. *J Control Release.* 2016;240:394-413. doi:10.1016/j.jconrel.2016.02.014
 119. Felice B, Prabhakaran MP, Rodríguez AP, Ramakrishna S. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. *Materials Science & Engineering C.* 2014;41:178-195.
 120. Akbarzadeh A, Rezaei-sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N. Liposome : classification , preparation , and applications. *Nanoscale Research Letters.* 2013;8(102):1-9.
 121. Tseng LP, Liang HJ, Deng MC, et al. The influence of liposomal adjuvant on intranasal vaccination of chickens against Newcastle disease. *Veterinary Journal.* 2010;185(2):204-210.
 122. Alam MI, Beg S, Samad A, et al. Strategy for effective brain drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2010;40(5):385-403.
 123. Even-Or O, Joseph A, Itskovitz-Cooper N, et al. A new intranasal influenza vaccine based on a novel polycationic lipid-ceramide carbamoyl-spermine (CCS). II. Studies in mice and ferrets and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine.* 2011;29(13):2474-2486.
 124. Tai W, Roberts L, Seryshev A, et al. Multistrain influenza protection induced by a nanoparticulate mucosal immunotherapeutic. *Mucosal Immunology.* 2011;4(2):197-207. doi:10.1038/mi.2010.50
 125. Chroboczek J, Szurgot I, Szolajska E. Virus-like particles as vaccine. *Acta Biochimica Polonica.* 2014;53(1):33-64.
 126. Wang S, Liu H, Zhang X, Qian F. Intranasal and oral vaccination with protein-based antigens: Advantages, challenges and formulation strategies. *Protein and Cell.* 2015;6(7):480-503.
 127. Krammer F, Grabherr R. Alternative influenza vaccines made by insect cells. *Trends in Molecular Medicine.* 2010;16(7):313-320.
 128. Lee Y-T, Ko E-J, Lee Y, et al. Intranasal vaccination with M2e5x virus-like particles induces humoral and cellular immune responses conferring cross-protection against heterosubtypic influenza viruses. *PLoS ONE.* 2018;13:e0190868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190868.g001>. Accessed November 13, 2019.
 129. Kim M-C, Song J-M, Kwon Y-M, Lee Y-J, Compans RW, Kang S-M. Virus-like Particles Containing Multiple M2 Extracellular Domains Confer Improved Crossprotection Against Various Subtypes of Influenza Virus. *The American Society of Gene & Cell Therapy.* 2013;21(2):485-492. doi:10.1038/mt.2012.246
 130. Mi Qi, Xian-En Zhang, Xianxun Sun, Xiaowei Zhang, Yanfeng Yao, Siling Liu ZC, Wei Li, Zhiping Zhang, Jianjun Chen and ZC. Intranasal Nanovaccine Confers Homo- and Hetero-Subtypic Influenza Protection. *Small.* 2018;14:e1703207.

131. Kim MC, Song JM, Eunju O, et al. Virus-like particles containing multiple M2 extracellular domains confer improved cross-protection against various subtypes of influenza virus. *Molecular Therapy*. 2013;21(2):485-492.
132. Liu Q, Zheng X, Zhang C, et al. Conjugating influenza a (H1N1) antigen to n-trimethylaminoethylmethacrylate chitosan nanoparticles improves the immunogenicity of the antigen after nasal administration. *Journal of Medical Virology*. 2015;87(11):1807-1815. doi:10.1002/jmv.24253
133. Dhakal S, Renu S, Ghimire S, et al. Mucosal immunity and protective efficacy of intranasal inactivated influenza vaccine is improved by chitosan nanoparticle delivery in pigs. *Frontiers in Immunology*. 2018;9(934):1-16. doi:10.3389/fimmu.2018.00934
134. Hervé P-L, Raliou M, Bourdieu C, et al. A Novel Subnucleocapsid Nanoplatform for Mucosal Vaccination against Influenza Virus That Targets the Ectodomain of Matrix Protein 2. *Journal of Virology*. 2014;88(1):325-338.
135. Youhui S, Wen Y, Kelly SH, Chong AS, Collier JH. Intranasal Delivery of Adjuvant-Free Peptide Nanofibers Elicits Resident CD8 + T Cell Responses Graphical Abstract Corresponding Authors: HHS Public Access. *J Control Release*. 2018;282:120-130.
136. Wee J, Scheerlinck J-P, Snibson K, et al. Pulmonary delivery of ISCOMATRIX influenza vaccine induces both systemic and mucosal immunity with antigen dose sparing. *Mucosal Immunol*. 2008;1:489-496. www.nature.com/mi. Accessed November 13, 2019.
137. Hartmann G, Poeck H, Wagner M, et al. Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood*. 2004;103(8):3058-3064.
138. Wilczewska A, Niemirowicz K, Markiewicz K, Car H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Report*. 2012;64:1020-1037.
139. Jong W, Borm P. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*. 2008;3(2):133-149.
140. Pimentel LF, Tavares A, Júnior J, Carla V, Mosqueira F, Santos-magalhães NS. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007;43(5):1-16.
141. Sharma S, Mukkur TKS, Benson HAE, Chen YAN. Pharmaceutical Aspects of Intranasal Delivery of Vaccines Using Particulate Systems. 2009;98(3):812-843.
142. Dehghan S, Tafaghodi M, Bolourieh T, et al. Rabbit nasal immunization against influenza by dry-powder form of chitosan nanospheres encapsulated with influenza whole virus and adjuvants. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;475(2):1-8.
143. Zhang† X, Xu X, Bertrand N. Interactions of nanomaterials and biological systems: implications to personalized nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64(13):1363–1384.
144. Cordeiro AS, Alonso MJ. Recent advances in vaccine delivery. *Pharmaceutical patent analyst*. 2016;5(1):49-73.
145. Zabel F, Kündig TM, Bachmann MF. Virus-induced humoral immunity: On how B cell responses are initiated. *Current Opinion in Virology*. 2013;3(3):357-362.
146. Pollard AJ, Savulescu J, Oxford, J. H, A. V. L, M. M, Lewis DJ. Human microbial challenge: the ultimate animal model. *The Lancet Infectious Diseases*. 2012:903-905. https://sci-

hub.se/[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70292-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70292-X). Accessed January 15, 2020.

147. Sherman AC, Mehta A, Dickert NW, Anderson EJ, Rouphael N. The Future of Flu: A Review of the Human Challenge Model and Systems Biology for Advancement of Influenza Vaccinology. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2019;9. doi:10.3389/fcimb.2019.00107