

**Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química e Farmácia**



Imunização oral: aplicações do quitosano em sistemas nanoparticulares

César Miguel Canha Rabi da Costa

Faro, 06 de novembro de 2012

**Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química e Farmácia**

Imunização oral: aplicações do quitosano em sistemas nanoparticulares

Monografia

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Orientando:

César Miguel Canha Rabi da Costa

Orientador:

Prof.^a Dr.^a Ana Margarida Grenha

Faro, 06 de novembro de 2012

Imunização oral: aplicações do quitosano em sistemas nanoparticulares

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 César Costa.

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:

À Professora Dr.^a Ana Margarida Grenha, pela dedicação e apoio prestados ao longo da elaboração desta monografia, bem como pela disponibilidade, celeridade, competência e rigor com que executou as suas funções de orientadora, professora e diretora de curso.

À Professora Isabel Ramalinho, pelos cabelos brancos e rugas que certamente ganhou na batalha incessante pelos interesses dos alunos e do curso.

Às várias direções de curso, pelo esforço e empenho dedicados ao longo destes 8 anos de existência.

A todos os docentes com quem travei conhecimento, pelos conhecimentos e experiências transmitidos e pela disponibilidade que sempre apresentaram.

Aos meus pais, amigos e namorada, que sempre me acompanharam e ajudaram nestes 5 anos de turbulência saudável e de vivências inesquecíveis.

À Redbull®, por me ter mantido acordado horas a fio na elaboração desta monografia.

Epígrafe:

Veni, vidi, vici.

Gaius Julius Caesar, líder militar e político da última república romana, em 47 a.C.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	II
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABELAS	III
1. RESUMO/ABSTRACT	IV
2. INTRODUÇÃO	1
3. NOTA HISTÓRICA.....	2
3. ANATOMOFISIOLOGIA DO SISTEMA IMUNITÁRIO.....	8
3.1. ANATOMIA DO SISTEMA IMUNITÁRIO.....	8
3.2. PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS DO SISTEMA IMUNITÁRIO	11
3.2.1. Caracterização do sistema imunitário inato.....	11
3.2.2. Caracterização do sistema imunitário adaptativo	12
3.2.2.1. Linfócitos	12
3.2.2.2. Imunoglobulinas	16
3.2.2.3. Características da resposta primária e secundária	18
3.2.2.4. Imunização	19
3.2.2.4.1. Imunidade passiva e ativa e vacinação	20
3.2.2.4.2. Vacinação por viaS mucosas.....	23
3.2.2.4.3. Vacinação por via oral.....	24
3.2.2.4.4. Mecanismo de ação das vacinas orais.....	26
4. NANOPARTÍCULAS NA ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS E VACINAS	28
4.1. AS NANOPARTÍCULAS E A SUA APLICAÇÃO NA IMUNIZAÇÃO ORAL.....	30
4.1.1. Princípios de formulação de nanopartículas	35
4.1.2. Transporte de nanopartículas através da mucosa intestinal	37
4.2. NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO PARA IMUNIZAÇÃO ORAL.....	42
5. VACINAÇÃO ORAL E CUSTOS ECONÓMICOS	49
6. CONCLUSÃO	51
7. BIBLIOGRAFIA.....	54
8. ANEXOS	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
AP: Agente patogénico
CAA: Célula apresentadora de antígeno
CHM: Complexo de histocompatibilidade maior
CM: Células M
Ig (A,D,E,G,M): Imunoglobulina (isótipo A,D,E,G,M)
IgAs: Imunoglobulina A secretória
IL: Interleucina
LB: Linfócito B
LB_m: Linfócito B de memória
LT: Linfócito T
LT_c: Linfócito T citotóxico
LT_h: Linfócito T auxiliar
LT_s: Linfócito T supressor
NP: Nanopartículas
PP: Placas de Peyer
TGI: Trato gastrointestinal
TI: Tolerância imunológica
VO: Vacina oral

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 3.2.1</i> – Localização dos órgãos linfóides primários e secundários no organismo humano.....	9
<i>Figura 3.2.12</i> – Corte histológico (40x) da porção ileal do intestino delgado a evidenciara localização das placas de Peyer.....	10
<i>Figura 3.3</i> – Esquema da estrutura base de uma imunoglobulina.....	17
<i>Figura 3.4</i> – Esquema da evolução da resposta imunitária adaptativa humoral.....	19
<i>Figura 3.15</i> – Esquema da resposta imunitária local a nível da mucosa intestinal.....	26
<i>Figura 3.11</i> – Esquematização da estrutura de nanocápsulas e nanosferas	31
<i>Figura 4.2</i> – Esquema do transporte de partículas através do epitélio intestinal.....	38
<i>Figura 3.13</i> - Resumo das estratégias de aperfeiçoamento da absorção das NP a nível do TGI.....	42
<i>Figura 3.14</i> - Representação das estruturas químicas da quitina e quitosano.....	43

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 4.1</i> - Resumo das vantagens e desvantagens das nanopartículas na administração de fármacos/Ag.....	33
<i>Tabela 4.2</i> - Resumo das vantagens e desvantagens do quitosano na formulação de nanopartículas.....	46

1. RESUMO/ABSTRACT

RESUMO

A vacinação é tida como o meio com melhor relação custo-efetividade disponível para a prevenção de perdas económicas e morbidades causadas por doenças infetocontagiosas. A par da via parenteral, dita convencional, existem vias menos dispendiosas, mais naturais e de carácter não-invasivo, como sejam as vias oral, nasal e ocular, entre outras. O desenvolvimento de técnicas, materiais e dispositivos que utilizam as vias mucosas para produzir imunização têm sido vistas como uma enorme potencialidade, pelo facto de possibilitar a produção de imunidade tanto local como sistémica e pelas diversas vantagens relativamente à via parenteral, como a melhor aceitação por parte da população e a redução de custos operacionais e logísticos.

A via oral tem sido a via mais explorada pelos investigadores nas novas abordagens para produzir imunização deliberada. Esta via apresenta como vantagens o facto de ser a via mais natural de administração de fármacos, a par de dispensar a presença de profissionais de saúde especializados para a sua administração e de esta ser uma via não-invasiva. A utilização de sistemas nanoparticulados acrescenta ainda mais vantagens a esta via de administração, ao proporcionar uma melhor absorção dos antigénios a nível do intestino, oferecendo ainda possibilidade de direccionamento dos mesmos a determinados grupos de células que possuem um papel relevante no desencadeamento da resposta imunitária. Estas nanopartículas podem ser formadas por diversos polímeros, sendo o quitosano um dos polímeros de eleição para efeitos de produção de imunização. Este polímero possui propriedades mucoadesivas, biocompatibilidade, biodegradabilidade e permite ainda um aumento transitório da permeabilidade da mucosa intestinal, favorecendo assim a absorção das nanopartículas ou dos antigénios.

Esta monografia pretende, desta forma, elaborar uma revisão relativamente ao conhecimento, funcionamento, potencialidades, limitações e custos relacionados com a utilização desta promissora tecnologia ao serviço da saúde.

Palavras-chave: vacinação oral, nanopartículas, quitosano, custo-efetividade.

ABSTRACT

Vaccination is considered the tool with greater cost-effectiveness available to prevent economic losses caused by diseases and morbidities due to infectious diseases. Apart from conventional parenteral route, there are routes less expensive, more natural and noninvasive nature, such as oral, nasal, ocular, among others. The development of techniques, materials, and devices that uses mucosal routes to produce immunization have been seen as a high potential, because of its ability to produce immunity both locally and systemically by various advantages over parenteral route, such as better acceptance by the population and the reduction of operating costs and logistics.

The use of nanoparticles systems adds further advantages of this route of administration, providing a better absorption of the antigen in the intestine while offering targeting skills to specific groups of cells having a role in triggering immune response. These nanoparticles can be formed of various polymers, being chitosan the choicest polymer to produce induced immunization. This polymer has mucoadhesive, biocompatible and biodegradable properties and also allows a transient increase in the permeability of the intestinal mucosa, thus favoring the absorption of nanoparticles or antigens.

This monograph intends to develop a revision concerning knowledge, functioning, strengths, limitations and costs associated with the use of this promising technology in the service of health.

Keywords: oral vaccination, nanoparticles, chitosan, cost-effectiveness

2. INTRODUÇÃO

De acordo com dados recentes da Organização Mundial de Saúde, estima-se que ocorreram cerca de 8,8 milhões de mortes de crianças entre os 0 e 59 meses de idade, em 2008, devido a doenças infecto-contagiosas (*e.g.* tétano, rotavírus, hepatite B, tosse convulsa, febre amarela). Esta mesma organização estima que 17% dessas mortes poderiam ter sido evitadas pela utilização de vacinas. Entretanto, têm sido feitos esforços no sentido de aumentar a percentagem de cobertura das vacinas nas camadas mais jovens das populações de países subdesenvolvidos e em vias de desenvolvimento, onde as doenças infectocontagiosas têm mais incidência e prevalência. Esses esforços resultaram, em 2004, numa cobertura de vacinação contra a hepatite B em crianças de 48%, um valor muito superior ao que havia sido registrado em 1992 (cerca de 3%). No entanto, as autoridades mundiais de saúde têm definido como prioridade o desenvolvimento de vacinas mais baratas, mais eficazes, mais estáveis e que dispensem a presença de recursos humanos especializados para a sua administração, com o intuito de poder estender os planos de vacinação adotados nos países desenvolvidos aos países com menos recursos económicos, evitando assim a perda de dezenas de milhares de vidas humanas. ⁽¹⁾

A vacinação por vias mucosas, e mais especificamente a via oral, tem sido vista como a solução ideal para responder a estas necessidades, visto que este tipo de imunização apresenta baixos custos operacionais, aliados a uma logística de administração muito simples e vantajosa, possibilitando assim a imunização em massa de populações num curto período de tempo, obtendo também melhores níveis de aceitação que as vacinas por via parenteral. Um exemplo de sucesso nestes aspetos foi a dupla campanha nacional de vacinação ocorrida em 1996, na Índia, com o intuito de imunizar cerca de 121 milhões de crianças contra a poliomielite. ^(2;3)

Apesar do sucesso inicial desta nova abordagem, tem sido demonstrado em vários estudos que é difícil de obter uma proteção efetiva contra os agentes patogénicos através da imunização por via oral. O exemplo anteriormente referido faz parte, precisamente, dos poucos exemplos de vacinas orais que conferem uma proteção efetiva ao indivíduo imunizado por este meio, sendo também escassas as vacinas orais aprovadas para comercialização. Entretanto, têm sido apontadas várias explicações para a ocorrência deste fenómeno: as condições adversas do trato gastrointestinal, rico em compostos muito ácidos e várias enzimas hidrolíticas que podem comprometer a viabilidade dos antígenos, os

mecanismos de tolerância imunológica e a fraca biodisponibilidade das vacinas orais parecem ser os fatores mais preponderantes que neste fracasso relativo da vacinação por via oral. ^(4,5,6)

De modo a contornar estes inconvenientes apresentados pela via oral, a comunidade científica tem-se empenhado em descobrir e desenvolver sistemas cada vez mais sofisticados e eficientes para a veiculação de vacinas por esta via. De entre esses sistemas, é dado maior destaque aos sistemas coloidais, nomeadamente às nanopartículas, que têm despertado um interesse crescente em vários campos científicos, a par da biomedicina e tecnologia farmacêutica. A nanotecnologia aplicada a formulações de vacinas orais veio melhorar alguns aspetos relacionados com a utilização desta via de administração sem alterar as propriedades do antigénio, protegendo-o inclusive das condições desfavoráveis do trato gastrointestinal, possibilitando também a libertação controlada e veiculação direcionada de vários antigénios com diferentes características e diferentes alvos terapêuticos, através da escolha de diferentes materiais para a formulação de nanopartículas. ^(7,8,9)

De entre os vários materiais existentes (tanto de origem natural como sintética) para a formulação de nanopartículas, destaca-se a cada vez maior utilização do quitosano e dos seus derivados em aplicações imunológicas, visto que este polímero apresenta um vasto conjunto de características vantajosas, tanto pelo seu baixo custo de aquisição e transformação como pelas suas características biológicas e físico-químicas que permitem uma série de modificações e adaptações, consoante a aplicação final que se pretende. O facto de o quitosano apresentar propriedades imunoestimulatórias e mucoadesivas faz deste polímero o veículo quase perfeito para a formulação de vacinas orais, não fosse a sua insolubilidade a pH fisiológico uma importante limitação da sua utilização. ^(10,11)

3. NOTA HISTÓRICA

A primeira referência a fenómenos imunológicos remonta ao séc. V a.C., pelas mãos de Tucídides, um reconhecido historiador da Grécia Antiga que escreveu a História da Guerra do Peloponeso, onde é relatada a guerra entre Esparta e Atenas. Nesse mesmo livro, Tucídides descreveu também uma epidemia de peste que assolou Atenas em 430 a.C., tendo observado que apenas os indivíduos que haviam sobrevivido a um anterior surto de peste se mantiveram saudáveis, podendo assim cuidar dos que padeciam dessa doença. ^(12,13)

No entanto, vários séculos se passaram sem que houvesse algum avanço digno de registo nesta área. A primeira tentativa de indução de imunidade deliberada surgiu apenas no séc. XV, época em que há registos que apontam a utilização de uma técnica denominada por variolização na China e Turquia. Esta técnica consistia na transferência do líquido das crostas (causadas pela varíola) de um indivíduo doente para pequenos cortes na pele de um indivíduo sã, sendo também referido que alguns indivíduos inalariam resíduos de pústulas secas e ingeririam pulgas provenientes de gado infetado. Estes foram, na verdade, os primeiros registos da prática de imunização oral e por via mucosa (neste caso em concreto a mucosa nasal). O método foi posteriormente importado para a Europa e amplamente utilizado em Inglaterra, apesar de ter provocado vários casos de morte por varíola.^(14,15)

Apesar da existência de vários registos históricos que evidenciam a tentativa de se proceder a uma imunização deliberada, o mérito desta é atribuído ao médico inglês Edward Jenner, devido ao rigor e metodologia científicos com que este apoiou as suas experiências. Em 1796, Edward Jenner inoculou uma criança de oito anos com o pus da mão variólica de uma leiteira, com o pressuposto de que, com a inoculação da varíola de origem bovina (*cowpox*), conseguiria evitar que a criança adoecesse com varíola humana (*smallpox*). Desta forma, passadas 6 semanas, inoculou novamente a criança (desta vez com a varíola humana), não tendo verificado qualquer reação transmissível da doença, como havia previsto. Um ano mais tarde, realizou nova inoculação na criança, não se revelando também nenhum episódio relacionado com a doença. Várias inoculações são posteriormente efetuadas por este mesmo método, sendo os resultados e observações publicados em 1798, num livro que marcou a história da ciência: “*An Inquiry into the cause and effects of the Variolae Vaccinae, a disease discovered in some of the western countries of England, particullary Gloucestershire, and known by the name of «cow-pox»*”. A importância desta obra relaciona-se não só com o facto de descrever a primeira tentativa científica para controlar uma doença infecciosa, através de uma inoculação deliberada e sistemática, como também por ter lançado os fundamentos da imunologia, cuja primeira teoria assentava ainda na geração espontânea.^(13,14,15)

Foi sensivelmente um século depois das descobertas de Edward Jenner que surgiram novos desenvolvimentos na área da imunologia, desta feita, pelas mãos de Louis Pasteur, um notório químico e biólogo de origem francesa. Em 1880, Pasteur iniciou os seus estudos sobre a raiva, uma zoonose causada por um vírus da família *Rhabdoviridae*, sendo que no ano seguinte Pasteur conseguiu isolar o vírus e realizar sucessivas experiências com este, resultando na obtenção de um vírus mais “estável”, com virulência

e período de incubação constantes, que podia ser reproduzido em laboratório, ou seja, um vírus atenuado, ao qual chamou de vacina (derivado do latim *vacca*), em honra dos trabalhos de inoculação desenvolvidos por Edward Jenner.^(13,16,17)

Embora Pasteur tenha provado que o processo de vacinação resultava, este desconhecia o mecanismo pelo qual o organismo combatia os agentes etiológicos das doenças. Foram os trabalhos experimentais de Emil von Behring e Shibasaburo Kitasato que, em 1890, demonstraram que era o soro (componente líquido dos coágulos sanguíneos) de animais previamente imunizados com difteria que possibilitava a “transferência” dessa imunização para animais não imunizados. Mais tarde, em 1930, demonstrou-se que uma determinada fração desse soro (a fração γ -globulina) era a responsável pela precipitação e/ou neutralização de toxinas e aglutinação de bactérias. As moléculas ativas presentes nessa fração do soro foram apelidadas de anticorpos e, visto que a imunidade aparentava advir destas moléculas presente nos fluidos corporais (antigamente denominados de humores), este tipo de imunidade foi apelidada de imunidade humoral.⁽¹³⁾

No entanto, ainda em 1883, Elie Metchnikoff observara que algumas células possuíam a capacidade de fagocitar microrganismos e partículas estranhas ao organismo, notando também que estas células possuíam maior atividade em animais previamente imunizados. Desta forma, Metchnikoff lançou a hipótese de que a imunidade seria maioritariamente mediada por células com atividade fagocitária, criando assim a corrente da imunidade celular, aceite por vários cientistas da época.⁽¹³⁾

Esta controvérsia científica foi mais tarde “resolvida” por Paul Ehrlich, em 1900, com a concepção da teoria da cadeia lateral, que aceitava a coexistência das duas hipóteses referidas anteriormente. Esta teoria assentava na premissa de que os microrganismos e/ou partículas estranhas ao organismo ligavam-se a recetores pré-formados presentes na superfície das células, conduzindo essa ligação à produção de mais recetores (*i.e.* anticorpos) com especificidade para o microrganismo e/ou partículas estranhas (mais tarde apelidados de antigénios).^(13,18)

O conceito de imunologia surgiu pela primeira vez em 1911, acompanhada da criação da *American Association of Immunologists* (em 1913) e do lançamento do *Journal of Immunology* (em 1916), que dedicou os seus primeiros 30 anos de existência às reações serológicas. A imunologia ganhava desta forma cada vez mais visibilidade e importância aos olhos do mundo, tanto através das suas contribuições para a melhoria dos cuidados de saúde das populações, como através das suas novas descobertas, que surgiam a um ritmo exponencial e que possuíam várias aplicações na área da medicina e afins.⁽¹⁸⁾

No período entre a I e a II Grande Guerra Mundial, foram vários os estudos que resultaram num aumento do conhecimento científico nesta área. Destacam-se as descobertas de Albert Coons, que utilizou a técnica de imunofluorescência para demonstrar a existência de antígenos e anticorpos no interior das células, enquanto que Merrill Chase e Karl Landsteiner relataram que a hipersensibilidade retardada poderia ser transferida pelas células e não pelo soro⁽¹⁹⁾. Em 1945, Ray Owen deu o seu contributo à ciência através da descoberta das quimeras sanguíneas em gémeos bovinos e, três anos mais tarde, Astrid Fargaeus demonstrou que os anticorpos eram produzidos pelos plasmócitos. Foi também durante o referido período que surgiram as vacinas contra a difteria (1923), tuberculose (1927), tétano (1927) e febre tifóide (1935).⁽²⁰⁾

O ano de 1950 marcou ainda o início da era moderna da vacinação, com o aparecimento das vacinas polissacarídeas bacterianas, desenhadas para prevenir infeções por *pneumococcus*, *meningococcus* e *Haemophilus influenzae*. A estreita associação no desenvolvimento da imunologia e da biologia molecular possibilitou que, durante os anos 50, surgissem diversas teorias que pretendiam explicar a formação dos anticorpos.⁽²⁰⁾

A primeira teoria de seleção surgiu em 1955, por Niels Jerne, e referia que a replicação de moléculas de γ -globulina (*i.e.* anticorpos) ocorria de forma aleatória, diversificada e após ligação ao antígeno. Esta teoria explicava, de facto, alguns dos conceitos postulados até à época, como a memória imunológica e a taxa logarítmica de aumento do número de anticorpos. No entanto, esta teoria acabou por revelar-se incompatível à luz novos conhecimentos adquiridos pela biologia celular e molecular. Passados dois anos, duas novas teorias surgiram: a primeira defendida por David Talmage e a segunda por Macfarlane Burnet. No entanto, ambas sugeriam que uma determinada célula (mais tarde, apelidada de linfócito) expressava recetores (*i.e.* anticorpos) à superfície da sua membrana, sendo que esses recetores possuíam especificidade para determinado antígeno. A especificidade do recetor era, desta forma, determinada antes da exposição ao antígeno, e seria a subsequente ligação entre o recetor da célula e o antígeno que despoletaria a proliferação de clones dessa mesma célula, com a mesma especificidade para o antígeno.^(13,18)

Esta teoria foi então apelidada de *Teoria da Seleção Clonal* e foi sendo refinada e aperfeiçoada em vários aspetos ao longo do tempo, bem como confirmada por numerosos estudos experimentais, sendo por isso considerada um paradigma estabelecido da imunologia moderna. Ganhou ainda uma grande notoriedade em 1975, aquando do

desenvolvimento da técnica de produção dos primeiros anticorpos monoclonais, da autoria de Georges Köhler e César Milstein.^(13,21)

No campo da vacinação e ainda no início dos anos 60, foi produzida a vacina contra a poliomielite, nas suas modalidades inativada (*Sank*) e por via oral (*Sabin*), sendo que esta vacina desempenhou um papel preponderante no programa de erradicação da poliomielite, levado a cabo por várias organizações mundiais de saúde. Para além disso, esta vacina veio demonstrar a crescente proeminência que a via oral começava, aos poucos, a ganhar no panorama da imunologia preventiva. Foi também neste período que começaram as descobertas relativas à vacina contra o vírus da hepatite, sendo que, em 1965, B. Blumberg e colaboradores descobriram o antígeno de superfície do vírus da hepatite B, presente no sangue de portadores desta infeção, abrindo assim caminho para a produção da vacina contra a Hepatite B, anos mais tarde, sendo esta considerada a primeira vacina de subunidades.⁽²²⁾

Em 1966, a imunologia celular conheceu outro ponto alto da sua história com a descoberta da presença e cooperação entre linfócitos T e linfócitos B, por Henry Claman, Edward Chaperon e R. F. Triplett. Desde então, os imunologistas direcionaram os seus esforços no estudo do desenvolvimento, especificidade e ativação dos linfócitos T e linfócitos B.^(18,23)

As décadas de 60 e 70 foram bastante produtivas no campo da imunologia, nomeadamente ao que concerne à estrutura e descrição do anticorpo como molécula composta por vários fragmentos e subdivisões. Foi ainda no ano de 1959 que a imunoglobulina foi separada em duas frações variáveis (*Fab's*) e uma fração constante (*Fc*), por Rodney Porter, enquanto as cadeias leves (*Lc's*) e pesadas (*Hc's*) foram separadas por Gerald Edelman.⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾ Mais tarde, em 1965, Norbert Hilschmann e Lyman Craig identificaram as regiões constantes e variáveis presentes nas *Fab's* e, quatro anos depois, é feita a primeira sequência completa dos aminoácidos pelas mãos de Edelman e colaboradores.^(26,27)

Os progressos alcançados nas décadas de 60 e 70 não se ficaram apenas pela estrutura dos anticorpos. Outros componentes importantes do sistema imunitário foram sendo identificados, separados e caracterizados, tais como as interleucinas, recetores celulares e componentes do complemento. Estes progressos deveram-se, em grande parte, à aplicação da já referida tecnologia de produção de anticorpos monoclonais. Foi precisamente esta tecnologia que permitiu a Patrick Kung e colaboradores a descoberta de um subgrupo de linfócito T (OKT4, atualmente designado por CD4), já em 1979.⁽²⁸⁾

A componente genética do sistema imunitário começou também a ganhar importância neste período, com a descoberta de que os genes da resposta imunológica estavam ligados aos genes do complexo principal de histocompatibilidade, em 1968. Seis anos depois, é constatado que o reconhecimento do antigénio pelos linfócitos T era exclusivo a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (CHM).⁽²⁹⁾ Mais tarde, e com o auxílio da nova técnica de ADN recombinante, foi possível demonstrar os rearranjos genéticos das imunoglobulinas, da autoria de Susumu Tonegawa (em 1978), e foi possível a produção de ratinhos transgénicos para utilização em modelos experimentais, por Jon Gordon e colaboradores (em 1980). O isolamento e identificação dos genes do recetor dos linfócitos T ocorreram em 1982 (por James Allison e colaboradores) e 1984 (por Mark Davis e colaboradores), respetivamente.^(30,31,32,33)

As grandes descobertas na área da Imunologia estiveram sempre aliadas à evolução e inovação em vários campos científicos e tecnológicos. Não é então de estranhar que, durante os anos 80 e 90, a Imunologia tenha sofrido uma evolução exponencial em todos os seus ramos, resultante de uma explosão tecnológica em várias áreas científicas. A investigação no campo da vacinação tomou também caminhos bastante complexos e tem sido largamente dedicada às vacinas de subunidades. A investigação em torno da Síndrome da Imunodeficiência Humana (SIDA) tem ocupado vastos orçamentos, mas poucos resultados práticos, contrariamente a algumas aplicações imunológicas ligadas à tentativa de prevenção de determinados tipos de cancro, como seja o exemplo da vacina contra o vírus do papiloma humano. No entanto, desde o início do século XXI, a comunidade científica, conjuntamente com algumas indústrias do sector farmacêutico e biotecnológico, têm apostado em novos sistemas, mecanismos e adjuvantes que, por um lado, possibilitem a libertação de fármacos ou partículas o mais circunscritamente possível ao alvo terapêutico e que, por outro lado, possuam vias de administração menos invasivas, como sejam as vacinas convencionais. O novo paradigma da vacinação tem-se centrado, desde então, em saber qual o antigénio a apresentar ao sistema imunitário, onde apresenta-lo e, acima de tudo, como apresenta-lo. Têm sido também efetuados esforços no sentido de tornar esta tecnologia cada vez mais eficiente e, sempre que possível, economicamente menos dispendiosa, com o intuito de alargar a sua população-alvo a países com menos recursos, mas com mais necessidade deste tipo de tecnologia.^(8,5,34,35,36,37)

3. ANATOMOFISIOLOGIA DO SISTEMA IMUNITÁRIO

O sistema imunitário pode ser definido como um conjunto de células, moléculas e órgãos que têm como principal finalidade a preservação ou reposição da homeostasia do organismo. Essa função processa-se, essencialmente, através da atuação conjunta e sincronizada das imunidades inata e adquirida, através de uma resposta rápida e eficaz contra os agentes patogênicos, bem como pela capacidade de memória imunológica que pode prevenir a reinfeção pelo mesmo agente patogênico e produzir uma resposta mais rápida e robusta. O reconhecimento e a neutralização de células cancerosas e/ou tecidos ou órgãos transplantados também são da responsabilidade deste sistema que, apesar de extremamente complexo, atua utilizando uma estratégia bastante simples de identificação (do agente patogênico), mobilização (da maquinaria imunológica), neutralização (da infecção) e recuperação tecidual e funcional do tecido ou órgão afetado.^(13,34)

3.1. ANATOMIA DO SISTEMA IMUNITÁRIO

Os órgãos linfóides estão, como o próprio nome indica, relacionados com a produção, crescimento e maturação dos linfócitos. Por sua vez, os linfócitos podem interagir com vários tipos de células e tecidos nesses órgãos, tanto no seu processo de maturação como durante o início de uma resposta imunitária adaptativa.^(13,34)

Os órgãos linfóides podem ser divididos em primários (centrais), onde ocorre a produção e maturação dos linfócitos, ou secundários (periféricos), onde os linfócitos são estimulados pelos antígenos (Ag's), desencadeando uma resposta imunitária adaptativa. A *Figura 3.1* esquematiza a localização dos diferentes órgãos linfóides existentes no organismo humano.^(13,34)

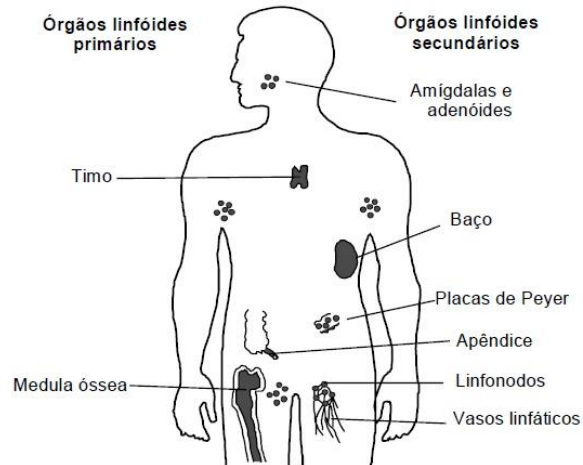


Figura 3.2.1 – Localização dos órgãos linfóides primários e secundários no organismo humano [adaptado de (38)].

Ainda na figura supracitada, refira-se um maior destaque para as placas de Peyer (também denominadas por Conglomerados Linfonodulares Ileares). Estes nódulos de tecido linfático constituem um componente principal do tecido linfático associado ao intestino (GALT) e localizam-se na parede do intestino delgado (principalmente na mucosa do íleo), na sua porção anti-mesentérica. (Figura 3.2). Atendendo a que, na maioria das patologias, o hospedeiro é usualmente infetado através das mucosas (digestiva, nasal, retal ou genital), as placas de Peyer assumem assim um papel preponderante no desencadeamento de uma resposta imunitária a nível da mucosa intestinal que culmina na produção de imunoglobulinas A secretoras (IgAs's), protegendo assim esta mucosa das agressões, tanto de microrganismos constituintes da microbiota intestinal como de microrganismos patogénicos que possam atingir esta mucosa. O conceito de que a IgAs pode oferecer proteção foi confirmado em estudos da vacina oral contra a poliomielite (Sabin), que induziu a produção de imunoglobulina A (IgA) no intestino, e também em estudos de resistência a uma variedade de viroses, bactérias e parasitas que infetam o trato respiratório ou digestivo. ^(3,39,40)

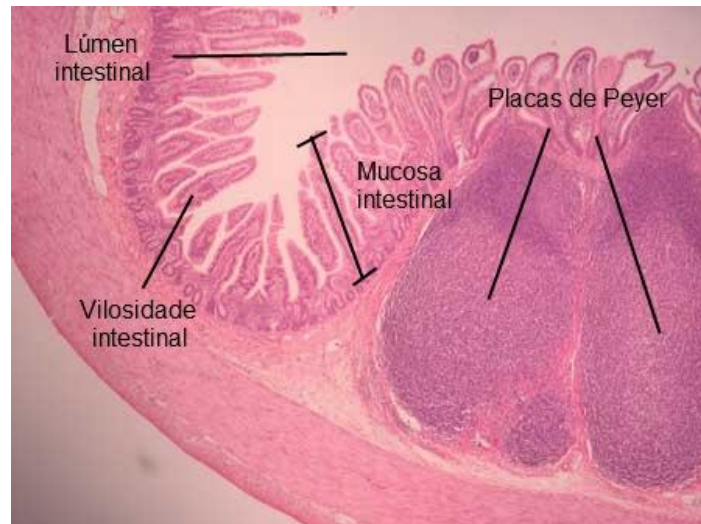


Figura 3.2.1 – Corte histológico (40x) da porção ileal do intestino delgado da localização das placas de Peyer [adaptado de (41)].

A par das placas de Peyer, existem outras estruturas que desempenham um papel fundamental na resposta imunitária a nível gastrointestinal, nomeadamente as denominadas células M (do inglês *microfold cells*). A descrição e o funcionamento destas estruturas serão aprofundados posteriormente.

O organismo humano é ainda dotado de várias barreiras que o protegem das agressões externas, com mecanismos de regulação e defesa distintos e a vários níveis, que podem ser divididas em barreiras físicas, barreiras químicas, sistema imunitário inato e sistema imunitário adaptativo. As barreiras físicas compreendem a pele e as mucosas (respiratória, intestinal, ocular...), que têm a função de impedir a penetração de substâncias externas ao organismo (tanto acidentais como intencionais). A pele funciona como um escudo protetor contra agentes invasores, enquanto o sistema respiratório possui um sistema composto por cílios e mucosas que apreendem pequenas partículas, expulsando-as através da tosse e espirros. Para além disso, tanto a pele como as membranas dos sistemas digestivo e respiratório possuem macrófagos e anticorpos que também auxiliam no processo de defesa contra invasores. Como barreiras químicas temos os vários fluidos do organismo (saliva, suor e lágrimas), que possuem na sua composição enzimas como a lisozima, com propriedades disruptivas da parede celular de muitas bactérias. Os ácidos do estômago também contribuem para a eliminação de grande parte dos microrganismos que são ingeridos juntamente com a alimentação, enquanto a temperatura e pH do organismo humano apresentam condições desfavoráveis para diversos agentes patogénicos. Já o sistema imunitário inato é designado como a primeira linha de defesa contra vários microrganismos. É constituído por células fagocitárias (macrófagos e neutrófilos), fatores

solúveis (sistema complemento) e algumas enzimas, desempenhando um papel preponderante na iniciação e subsequente direcionamento da resposta imunitária dada pelo sistema imunitário adaptativo (que pode demorar alguns dias a exercer o seu efeito), controlando assim a infecção numa fase inicial. Relativamente ao sistema imunitário adaptativo, devido à complexidade inerente ao funcionamento deste, o mesmo será abordado em maior pormenor na *secção 3.2.2.* ^(13,34,42)

3.2.PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS DO SISTEMA IMUNITÁRIO

O sistema imunitário tem como base de funcionamento dois mecanismos de ação pelos quais confere proteção ao organismo humano contra agentes invasores. O primeiro é dotado de uma reposta imunológica rápida e eficaz, mas de curta duração de ação (resposta imunitária inespecífica ou inata), e o segundo é caracterizado por uma resposta mais lenta, igualmente eficaz, e de longa duração de ação (resposta imunitária específica ou adaptativa). ⁽¹³⁾

Ambos os sistemas (inato e adaptativo) são dependentes da atividade dos leucócitos, sendo a imunidade inata mediada essencialmente por macrófagos e granulócitos (neutrófilos, basófilos e eosinófilos) e a imunidade adaptativa mediada por linfócitos (B e T). No *Anexo I* encontra-se esquematizada a origem e diversificação dos vários componentes celulares que compõem o sistema imunitário. ⁽¹³⁾

3.2.1. CARATERIZAÇÃO DO SISTEMA IMUNITÁRIO INATO

O sistema imunitário inato tem como principais características a sua celeridade na resposta a um agente invasor, sendo que as células envolvidas na sua mediação estão imediatamente disponíveis para combater uma ampla variedade de agentes patogénicos, sem que haja necessidade de ocorrer uma prévia exposição aos mesmos (*i.e.* não depende do Ag nem tem especificidade para este). A resposta imunológica é máxima de imediato (ou seja, não é dependente da dose de Ag), mas também não é produzida memória imunológica, pelo que o combate ao agente invasor será sempre efetuado nas mesmas condições que combates anteriores, caso as condições do organismo se mantenham também as mesmas. ^(13,42,43)

Os macrófagos e neutrófilos são os responsáveis pela ingestão e digestão de vários microrganismos e Ag's. Os macrófagos (a par das células dendríticas e dos LB's) são células que possuem a habilidade de apresentar os Ag's a outras células do sistema

imunitário, sendo por isso também denominados de células apresentadoras de Ag's (CAA's). Por outro lado, os macrófagos são também auxiliados por outros componentes do sistema imunitário (como os Ac' e o complemento) que opsonizam o Ag, aumentando assim a capacidade fagocitária dos macrófagos. Estas células possuem ainda enzimas do sistema oxidativo que auxiliam a digestão dos Ag's.⁽⁴²⁾

Já os granulócitos (ou leucócitos polimorfonucleares) são células que possuem núcleos multilobados que encerram em si grânulos citoplasmáticos preenchidos com enzimas oxidativas (tais como a lactoferrina, catelicidina e mieloperoxidase, entre outros). Os neutrófilos têm também, como já foi referido, uma importante função fagocitária e são os elementos celulares mais numerosos desta classe, sendo também os primeiros a chegar ao local da inflamação/infeção. Os eosinófilos possuem um papel crucial na defesa do organismo contra infeções parasitárias e controlam mecanismos associados com a alergia e asma, juntamente com os mastócitos. A função dos basófilos não está ainda bem definida, mas sugere-se que estes estejam envolvidos no processo de respostas alérgicas e anafiláticas, sendo os menos abundantes no organismo (inferior a 1%).^(42,44)

3.2.2. CARATERIZAÇÃO DO SISTEMA IMUNITÁRIO ADAPTATIVO

Contrariamente à anterior, a resposta imunitária adaptativa está dependente do tipo de Ag, ou seja, a resposta imunológica terá diferentes características consoante o tipo de Ag que estiver presente. Esta resposta é essencialmente mediada por linfócitos, sendo que o intervalo entre a exposição ao Ag e o desencadeamento de uma resposta imunitária adaptativa é também mais moroso, podendo demorar alguns dias após o contacto com o Ag, mas sem dúvida que a propriedade mais importante deste tipo de resposta é a de gerar memória imunológica, ou seja, a capacidade de reconhecimento do mesmo estímulo antigénico (caso este entre de novo em contacto com o organismo) e a sua rápida e efetiva inativação, impedindo assim o restabelecimento da doença. É precisamente desta propriedade que o processo de vacinação tira partido, ao proporcionar artificialmente o primeiro contacto do Ag com o organismo, ganhando assim imunidade a esse mesmo Ag.^(34,45)

3.2.2.1. LINFÓCITOS

Os linfócitos têm origem nos progenitores linfóides da medula óssea (ver *Anexo D*), que se diferenciam depois em linfócitos T, B e NK (*Natural Killers*). As células que vão

diferenciar-se em linfócitos T (LT) deixam a medula óssea e migram para o timo, onde ocorre todo o processo de seleção e maturação. Apenas os LT's maduros deixam o timo e entram na circulação. As células que vão diferenciar-se em linfócitos B (LB) permanecem na medula óssea e, após concluir a sua maturação nesta, entram na circulação, migrando para os órgãos linfóides secundários, onde ficam armazenados. ⁽¹³⁾⁽⁴⁵⁾

Os LB's possuem à sua superfície moléculas responsáveis pelo reconhecimento de Ag, nomeadamente as imunoglobulinas de membrana (IgM e IgD), usualmente denominadas por recetores de linfócitos B (BCR). A especificidade dos BCR's é determinada ainda na fase da maturação do LB's, aquando do processo recombinatório dos diferentes segmentos que compõem as porções variáveis das cadeias pesadas e leves das Ig's. Note-se que deste processo resultam cerca de 10^{11} especificidades diferentes de reconhecimento pelas Ig's, que são posteriormente filtradas por mecanismos de seleção positiva e negativa. ^(13,46)

Os LB's são responsáveis pela imunidade humoral, que se caracteriza pela produção e libertação de Ac's capazes de neutralizar e/ou destruir os Ag's contra os quais foram gerados. Os LB's necessitam primeiro de ser ativados, o que pressupõe um processo de proliferação e diferenciação que culmina na conceção de Ig's com alta afinidade para o epítopo antigénico (designação atribuída à menor porção de Ag com potencial de gerar resposta imunitária) que originou a resposta. A ligação de um epítopo antigénico aos BCR resulta na ativação dos LB's, desencadeando o processo de diferenciação pelo qual os LB's se convertem em plasmócitos e LB's de memória (LB_m's). Os plasmócitos sintetizam e secretam grandes quantidades de Ig's que atuam contra Ag's específicos, desempenhando assim um importante papel na regulação da resposta imunitária humoral. Relativamente aos LB_m's, sabe-se que estes adquirem uma maior longevidade após diferenciação, sendo capazes de responder mais rapidamente a uma segunda exposição ao mesmo antígeno. ^(34,45)

Os LB's funcionam também como CAA's, após internalização e processamento do complexo Ag-BCR. Os peptídeos resultantes desse processo são depois expressos na membrana dos LB's, estando ligados a moléculas do complexo maior de histocompatibilidade tipo II (CHM-II) para posterior apresentação aos LT's, mais concretamente aos LT's auxiliares (ver *secção 3.2.2.1.2*). A interação entre o complexo Ag-CHM-II e o recetor dos LT's (TCR) resulta no início de uma cadeia de reações que conduzem os LT auxiliares (LT_{CD4}'s) à expansão clonal e produção de citocinas (nomeadamente as IL-2) que, por sua vez, estimulam a proliferação e diferenciação dos

LB's (ver *Anexo II*). Note-se que a resposta dos LB's a Ag's peptídicos requer o auxílio dos LT_{CD4}'s, sendo por isso designados por antígenos T-dependentes. No entanto, os restantes antígenos não-proteicos não necessitam da cooperação dos LT_{CD4}'s, sendo então designados de antígenos T-independentes.⁽⁴⁶⁾

As proteínas do complemento também fornecem sinais secundários para a ativação dos LB's, através do recetor para o fragmento C3d (denominado CR2) presente na superfície dos LB's. O CR2, juntamente com duas outras proteínas de membrana (CD19 e CD81), formam um complexo proteico que permite o reconhecimento simultâneo do fragmento C3d e do Ag pelo BCR, promovendo o início de uma cascata de sinalização de ambos os recetores, gerando assim uma resposta amplificada em relação à resposta que seria verificada sem a presença do complexo Ag-C3d. Todo este processo referente à ligação C3d-CR2 garante o despoletar de uma resposta imunitária frente a microrganismos e Ag's que ativem o complemento, garantido também a amplificação da resposta imunitária humoral, dado que alguns anticorpos possuem a capacidade de ativar o complemento, o que resulta na estimulação indireta dos LB's (ver *Anexo II*).^(45,46)

Os LT's têm como principais funções a regulação das ações de outras células e o ataque direto às células infectadas do organismo hospedeiro e, à semelhança dos LB's, possuem na sua superfície estruturas moleculares com função de reconhecimento antigénico e de sinalização celular que são expressos no processo de maturação, juntamente com os coreceptores CD4 e/ou CD8. O recetor de Ag dos LT's (TCR) possui algumas diferenças estruturais em relação aos BCR's, nomeadamente em relação à capacidade de reconhecimento de Ag's, visto que o TCR apenas reconhece Ag's já processados e ligados a uma molécula de CHM. Desta forma, as CAA's capturam uma proteína antigénica exógena e processam-na (ingestão e digestão) de forma a clivá-la em pequenos fragmentos peptídicos que, posteriormente, se ligam a uma molécula de CHM. O complexo Ag-CHM é depois transportado até à superfície da CAA, onde pode interagir com um LT_{CD4}.^(45,47)

O TCR é expresso na membrana dos LT's em conjunto com um outro complexo composto por proteínas da família das imunoglobulinas, designado por CD3, sendo o TCR responsável pelo reconhecimento do complexo Ag-CHM e o CD3 responsável pela sinalização celular subsequente. Estruturalmente, o TCR é um heterodímero formado por duas cadeias peptídicas da superfamília das imunoglobulinas. Essas cadeias têm uma região variável e uma região constante e são formadas a partir de segmentos gênicos que sofrem um complexo processo de recombinação durante a maturação dos LT. A grande

diversidade de repertório dos LT maduros deve-se ao processo de recombinação somática, na qual existe uma conjugação de vários genes, cuja diversidade de repertório potencial dos LT ronda os 10^{16} .^(45,47)

Resumidamente, o processo de maturação dos LT ocorre em etapas sequenciais que envolvem a recombinação somática e expressão do TCR, proliferação das células, expressão dos coreceptores CD4 e CD8 e seleção positiva e negativa induzida por apresentação de Ag próprios por células do estroma tímico. Na primeira etapa da maturação ocorre o rearranjo dos genes do TCR e a expressão de níveis baixos de CD4 e CD8 na superfície dos timócitos (células precursoras dos LT's), sendo, portanto, duplamente positivos. De seguida, os timócitos migram em direção à medula tímica e entram em contato com Ag's próprios apresentados pelas células epiteliais do estroma tímico. Nesta fase (apelidada de restrição pelo CHM), apenas os timócitos que se ligam ao complexo Ag próprio-CHM com afinidade adequada recebem estímulo para sobreviver (seleção positiva), enquanto os timócitos cujo TCR não apresenta nenhuma afinidade pelo CHM próprio sofrem apoptose pela falta de estímulo (seleção negativa). A este ponto, a interação com moléculas CHM de classe I ou II determinam a diferenciação do timócito em LT_{CD8} ou LT_{CD4} , respetivamente. Continuando o processo de maturação, os timócitos que sobreviveram à seleção positiva e expressaram apenas o co-recetor CD4 ou CD8 migram em direção à medula, onde entram em contato com células dendríticas e macrófagos (CAA's). Nesta etapa, as CAA's apresentam Ag's próprios associados ao CHM, sendo que os timócitos imaturos que interagem com elevada afinidade com esses complexos são eliminados por apoptose (mecanismo de tolerância central), enquanto as células que sobrevivem (pelo mecanismo de educação tímica) tornam-se LT's maduros, prontos para abandonarem o timo e exercerem as suas funções em órgãos e tecidos periféricos. Note-se que, deste processo, apenas cerca de 5% das células que entram no timo tornam-se LT's maduros.^(45,47,48)

Funcionalmente, os LT's ativados sofrem expansão clonal e dividem-se, essencialmente, em três subtipos, de acordo com a função que desempenham quando um determinado Ag é apresentado. O LT_{CD4} tem como principal função emitir sinais a outras células, a fim de promover uma resposta efetiva contra o agente agressor. Este subtipo de LT utiliza o seu recetor de superfície (CD4) para interagir com as CAA's, reconhecendo assim epítomos do Ag apresentado por estas. Estes LT_{CD4} 's exercem ainda uma função de regulação e estimulação do crescimento e proliferação de LT_{CD8} , LT supressores (LT_{sup}) e LB's (que se diferenciam depois em plasmócitos). São também responsáveis pela ativação de

macrófagos e de promoverem a sua auto-estimulação, ou seja, um determinado LT_{CD4} consegue estimular o crescimento de toda população de LT_{CD4} , num processo que envolve a secreção de IL's de vários tipos, sendo as mais importantes a IL-2, IL-4 e IL-10, por estarem relacionadas também com a resposta imunitária humoral. ⁽³⁴⁾ Relativamente ao subtipo dos LT_{CD8} 's, estes possuem na sua membrana recetores de superfície do tipo CD8, cuja principal função está ligada ao reconhecimento de células que expressam o CHM-I (ou seja, todas as células nucleadas), promovendo assim a lise celular dessas mesmas células, caso estejam infetadas. São, como já havia sido referido, estimulados por via das IL-2, produzida pelos LT_{CD4} , que efetuam desta maneira a regulação da expansão clonal de LT_{CD8} na resposta imunitária mediada por células. Em relação aos LT_{sup} , ainda pouco se sabe sobre o seu mecanismo de ação, mas foi demonstrado que este subtipo de LT modula a resposta imunitária através da emissão de estímulos inibitórios, nomeadamente através da inativação dos LT_{CD4} e LT_{CD8} , limitando e controlando assim a reação imunitária, para além de utilizar um mecanismo de feedback negativo com os LT_{CD4} . Desta forma, temos que os LT_{CD4} modulam a sua própria ação ao ativarem os LT_{sup} , impedindo assim que se verifique uma atividade imunológica excessiva por parte dos LT_{CD4} . ⁽⁴⁵⁾ Os LT_{sup} possuem também um papel na designada tolerância imunológica, mecanismo pelo qual o sistema imunitário impede que os linfócitos exerçam os seus efeitos sobre as próprias células do organismo. ^(47,49)

Toda esta descrição relativamente ao funcionamento dos linfócitos faz transparecer toda a complexidade inerente ao desempenho do sistema imunitário, bem como toda a coordenação e interdependência dos processos que conduzem ao objetivo principal deste sistema que é a manutenção ou recuperação da homeostasia.

3.2.2.2. IMUNOGLOBULINAS

As imunoglobulinas (Ig's) são moléculas plasmáticas glicoproteicas da família das γ -globulinas e são produzidas pelos plasmócitos, em resposta a um imunogénio (relembre-se que nem todos os Ag's têm potencial para desencadear uma resposta imunológica), funcionando como Ac's numa resposta imunitária. Entre as suas funções, destacam-se as de ligação a Ag's (bloqueando a sua ação direta no organismo), ativação e fixação do complemento e mediação de vários outros processos que resultam na degradação do Ag que deu origem ao Ac em questão. ^(34,45)

Estruturalmente, as Ig's diferem ligeiramente umas das outras (consoante a sua classe), mas a sua constituição base assenta em quatro cadeias (duas leves e duas pesadas) interligadas por pontes de dissulfeto (inter e intracadeias). Ambas as cadeias leves e pesadas são ainda subdivididas em regiões variáveis e regiões constantes, constituídas por diferentes sequências de aminoácidos, que resultam numa enorme variabilidade de combinações e, portanto, de especificidades para o Ag. As Ig's possuem ainda uma região de dobradiça, que confere uma determinada flexibilidade da molécula. A *Figura 3.3* ilustra a estrutura base de uma Ig.^(13,34)

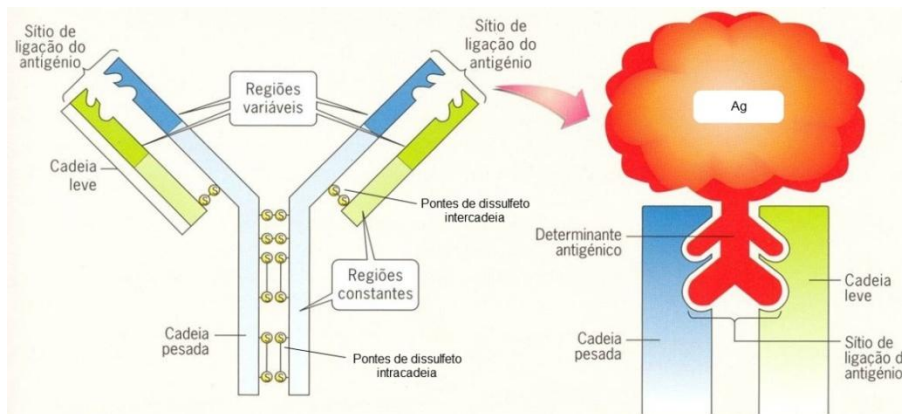


Figura 3.3 – Esquema da estrutura base de uma imunoglobulina [adaptado de (50)].

As imunoglobulinas podem ser divididas em cinco classes diferentes (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), com base nas diferenças nas sequências de aminoácidos na região constante das cadeias pesadas. De entre estas classes, destaque-se a importância e predominância da IgA nos processos de imunidade local nas mucosas do organismo humano e nas várias secreções externas (lágrimas, leite, saliva e muco). Apesar de constituir apenas 10% a 15% do total de Ig's do soro, o organismo tem uma produção de IgA maior do que a de todos os outros isotipos combinados, sendo que a IgA apresenta valores de concentração superiores a 1 mg/mL nas secreções associadas a superfícies mucosas. Acrescidamente, a IgAs (IgA de secreções externas) é dotada de uma maior resistência à degradação por parte das proteases presentes nas mucosas, para além de executar também um mecanismo denominado de exclusão imunitária, que consiste no aprisionamento de Ag's ou microrganismos, prevenindo assim o contato direto entre o Ag ou MO com a superfície mucosa. A IgAs pode ainda bloquear ou dificultar estereoquimicamente as moléculas de superfície dos microrganismos que desempenham funções de ancoragem às mucosas.^(13,34,45)

3.2.2.3. CARACTERÍSTICAS DA RESPOSTA PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA

As respostas dos Ac's à primeira exposição e às exposições subsequentes a um determinado Ag, designadas por resposta primária e resposta secundária (respetivamente), diferem tanto quantitativa como qualitativamente.

O primeiro contato com um Ag, por exposição natural ou processo de vacinação, leva à ativação de LB's ditos "virgens", que se diferenciam depois em plasmócitos produtores de anticorpos e em LB_m's, resultando na produção de anticorpos específicos contra o Ag indutor. Após o início da resposta, observa-se uma fase de aumento exponencial dos níveis de Ac's, seguida de uma fase denominada *plateau* (patamar), na qual os níveis de Ac's não se alteram. Segue-se a última fase da resposta primária, a fase de declínio, na qual ocorre uma diminuição progressiva dos Ac's específicos circulantes.^(34,45)

Ao entrar em contato com o mesmo Ag pela segunda vez, o organismo vai produzir uma resposta muito mais rápida, pois já existe uma população de LB's capazes de reconhecer esse Ag, devido à expansão clonal e produção de LB_m's geradas na resposta primária. A resposta secundária difere da primária em vários aspetos: a dose de Ag necessária para induzir a resposta é menor, a fase de latência (período entre o contato do Ag e a resposta imunológica desencadeada pela presença deste) é mais curta, a fase exponencial é mais acentuada e a produção de Ac's é mais rápida e são atingidos níveis mais elevados. Também a fase de *plateau* é alcançada mais rapidamente e é mais duradoura, sendo a fase de declínio mais lenta e persistente. A magnitude da resposta secundária depende também do período decorrido desde o contato inicial com o Ag: a resposta terá uma menor magnitude se o intervalo for muito curto ou muito longo. Se for muito curto, os Ac's ainda presentes (provenientes da resposta primária) formam complexos Ag-Ac que são rapidamente eliminados, e se for muito longo, é possível que concentração de LB_m's tenha diminuído gradualmente com o tempo, embora a capacidade para deflagrar uma resposta secundária possa persistir por meses ou anos. O período ótimo para a indução de resposta secundária é logo após a queda do nível de Ac's da resposta primária, abaixo dos limites de deteção.^(34,45)

Nos dois tipos de resposta, primária e secundária, há a produção dos isótipos IgM e IgG, mas em diferentes proporções. Na resposta primária, a IgM é a Ig com maior expressão, sendo a produção de IgG menor e mais tardia. Já na resposta secundária, a IgG é a Ig predominante. Em ambas as respostas, a concentração de IgM sérica diminui muito

mais rapidamente de maneira (observa-se a sua queda acentuada após uma a duas semanas), enquanto a produção de IgG é mais persistente. A *Figura 3.4* pretende resumir o comportamento e evolução de cada uma das respostas imunitárias ao longo do tempo. ^(13,45)

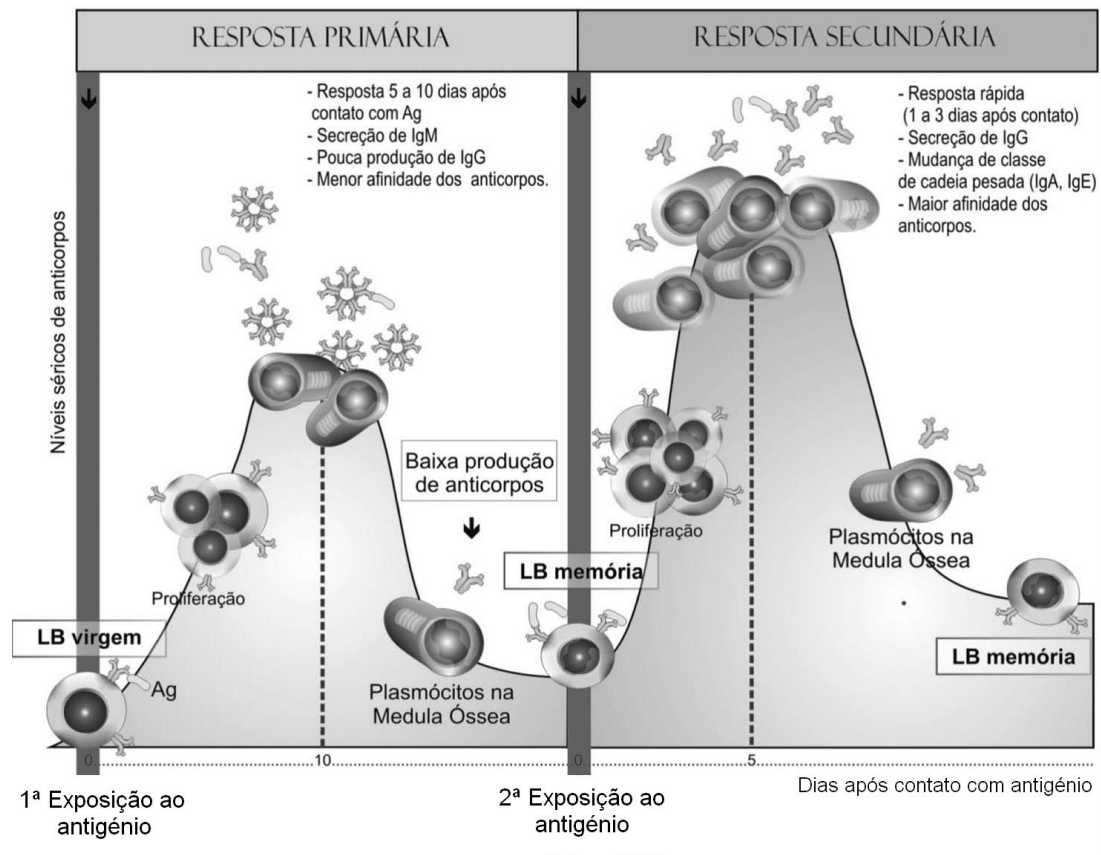


Figura 3.4 – Esquema da evolução da resposta imunitária adaptativa humoral [adaptado de (45)].

3.2.2.4. IMUNIZAÇÃO

A imunização é definida como o meio de adquirir uma proteção específica contra a maioria dos agentes patogénicos (AP's) nocivos mais comuns. O mecanismo da imunidade depende do local onde está o AP e também do mecanismo pelo qual exerce a sua patogenicidade. Desta forma, se o mecanismo da patogénese envolver a produção de exotoxinas, os únicos agentes imunitários eficientes seriam os Ac's que preveniriam a ligação dessas exotoxinas ao recetor alvo no organismo, promovendo também a sua degradação e eliminação pelos fagócitos. Por outro lado, se o AP produz um estado de doença por outros meios, os Ac's teriam que reagir de forma a eliminá-lo por lise mediada pelo complemento ou fagocitose e morte intracelular. Resta ainda a hipótese de o AP estar localizado intracelularmente, situação em que este não está acessível aos Ac's. A maioria das infeções virais, bactérias intracelulares e protozoários são exemplos desta última situação. Nestes casos, as células que contêm os AP's têm que ser destruídas por elementos

da imunidade celular ou, caso a célula infetada expresse Ag's especiais reconhecíveis por Ac's, a morte dependente de Ac's ou do complemento pode expor os AP's aos elementos da imunidade humoral. A imunidade específica pode resultar em imunização passiva ou ativa e ambos os modos de imunização podem ocorrer por processos naturais ou artificiais. ^(13,34,51)

3.2.2.4.1. IMUNIDADE PASSIVA E ATIVA E VACINAÇÃO

A imunidade passiva pode ser adquirida sem que o sistema imunitário seja estimulado por um Ag, através da transferência de soro ou γ -globulinas de um dador imunizado para um indivíduo não imunizado. A imunidade passiva pode ser naturalmente adquirida ainda no período fetal, através da transferência placentária de IgG ou transferência pelo colostro (leite de baixo volume secretado nos primeiros dias de amamentação pós-parto) de IgA da progenitora. A imunidade passiva artificialmente adquirida processa-se quando há transferência de γ -globulinas de outros indivíduos ou γ -globulinas de um animal imunizado, e é praticada em numerosas situações agudas (como infecções e envenenamentos) e como medida profilática. ^(34,51)

A imunidade ativa, como o próprio nome indica, já requer a participação do sistema imunitário do indivíduo na resposta à exposição a um Ag. A imunidade ativa naturalmente adquirida processa-se pela exposição a diferentes AP's que conduzem a infecções sub-clínicas ou clínicas, que resultam numa resposta imunitária efetiva contra esses AP's. Já a imunidade ativa artificialmente adquirida pressupõe uma administração deliberada de AP's (vivos ou mortos), geralmente através de um processo de vacinação. ^(13,34)

As vacinas utilizadas para gerar imunização ativa podem ser constituídas por organismos vivos atenuados (vacinas vivas), organismos mortos, componentes celulares ou toxinas secretadas (vacinas mortas). ⁽³⁴⁾

As vacinas vivas são largamente utilizadas contra várias infecções virais, como sejam a poliomielite (*Sabin*), sarampo, rubéola, varicela, hepatite A e febre tifóide, entre outras. O único exemplo de vacina bacteriana viva é a da tuberculose (*Mycobacterium bovis*). Geralmente, as vacinas vivas produzem infecções não clínicas autolimitadas (*i.e.* o curso natural da doença evolui naturalmente para a cura) e levam a um subsequente estado de imunidade (tanto humoral como mediada por células). No entanto, este tipo de vacina possui algum risco de provocar uma infeção em indivíduos imunocomprometidos, para

além de existir também o risco da revertência da atenuação, situação que pode conduzir à produção de doença no indivíduo em que foi administrada a vacina.^(22,34,51)

As vacinas mortas apresentam, desde logo, a vantagem de serem totalmente desprovidas de poder infeccioso, ao mesmo tempo que mantêm a sua capacidade de provocar imunização. No entanto, apresenta a desvantagem de não apresentar uma resposta imunitária dita ótima, pelo que requer, por vezes, a associação de adjuvantes ou proteínas transportadoras e a administração de várias doses de reforço para manter o estado de imunidade. Os exemplos de vacinas virais mortas (por meio de aquecimento, agentes químicos ou irradiação ultravioleta) incluem as contra a poliomielite (*Salk*), influenza e raiva, entre outras. A maioria das vacinas bacterianas são organismos mortos (como as do tifo, cólera, peste bubónica, tosse convulsa, etc.), mas existem outras vacinas bacterianas que utilizam somente os componentes das suas paredes celulares (como as de *Haemophilus*, tosse convulsa, meningococos, pneumococos, etc.).^(22,34,52)

Existem ainda algumas vacinas que são constituídas apenas por subcomponentes de AP's, usualmente proteínas e polissacarídeos. Dado que os polissacarídeos são moléculas que apresentam fraco poder de imunogenicidade (produzindo apenas respostas com produção de IgM e sem memória imunológica), estes são geralmente conjugados com proteínas, sendo exemplo desta prática as vacinas contra *Haemophilus*, meningococos e pneumococos, entre outros. Já as vacinas contra a hepatite-B e raiva consistem em proteínas antigénicas clonadas num vetor adequado, sendo que este processo pretende reduzir o risco de toxicidade associado a essas proteínas. Quando o mecanismo patogénico de um agente envolve uma toxina, é utilizada uma forma modificada dessa toxina (denominada toxóide ou anatoxina) na conceção da vacina, como no caso das vacinas contra a difteria, tétano e cólera. Note-se que, embora percam a sua toxicidade, as anatoxinas mantêm a sua capacidade imunogénica.⁽⁵²⁾

A imunização ativa dita convencional (*i.e.* por via parenteral, sendo as mais comuns as vias intramuscular e subcutânea) apresenta alguns inconvenientes relacionados com a sua via de administração, para além das restantes complicações inerentes ao processo de imunização. Desde logo, pesa o facto de a via parenteral ser uma via invasiva e dolorosa para o indivíduo a ser imunizado, sendo que também existe a necessidade de garantir as condições mínimas de assepsia do local de administração e do próprio operador que, idealmente, deverá possuir conhecimentos técnico-científicos suficientes para administrar a vacina nas melhores condições e responder prontamente a alguma situação adversa/inesperada decorrente da administração da vacina. Os custos inerentes a esta via de

administração também são avultados, visto que todo o processo de investigação, produção, transporte e armazenamento das vacinas envolve grandes investimentos em infraestruturas adequadas que mantenham a cadeia de frio e recursos humanos com um maior grau de especialização, que são depois repercutidos no valor final de cada vacina. O material necessário à administração de vacinas por via parenteral (*i.e.* seringas, agulhas, luvas, *kit* de choque anafilático etc.) também contribui para o aumento do custo final desta tecnologia, visto que esses materiais têm de ser esterilizado e, após a sua utilização, têm de ser convenientemente inativados e incinerados. ^(3,53,54)

Para além dos inconvenientes citados no parágrafo anterior (relacionados com a via de administração), a imunização ativa apresenta alguns efeitos adversos e até contra-indicações inerentes ao próprio processo. Os efeitos adversos podem ser divididos em três grupos: reações locais e sistémicas de pequena gravidade (dor no local da punção, mal estar, febre), reações sistémicas que necessitam de assistência médica, mas que não implicam risco de vida ou invalidez (convulsões isoladas, anafilaxia, hipotonia muscular e diminuição das respostas a estímulos externos) e reações sistémicas graves, com risco de vida e de invalidez permanente (alterações de comportamento, encefalopatia e morte). Estas reações podem decorrer nas primeiras 72 horas após a administração da vacina mas, felizmente, a grande maioria das reações adversas é leve e transitória, ficando-se pela dor no local da aplicação e febre, que se resolvem espontaneamente ou com tratamento sintomático. ^(34,51,54)

É importante frisar que as vacinas atualmente disponíveis são bastante seguras e eficazes, mas não há vacinas que sejam totalmente seguras, assim como não há vacinas totalmente eficazes. Importa também ressaltar que muitos eventos adversos graves são descritos sem que haja uma comprovação definitiva de sua relação causal com a vacinação (como no caso das encefalopatias). Na prática clínica diária, as principais urgências relacionadas com a imunização são as síncope (perda de consciência autolimitada e transitória) e as reações anafiláticas. ^(34,51)

Desta forma, a vacinação é, sem qualquer sombra de dúvida, uma ferramenta importantíssima na delicada tarefa de gestão da saúde das populações, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. No entanto, o atual panorama mundial impõe a necessidade de uma alternativa mais eficaz, efetiva, barata, confiável e com melhores índices de aceitação por parte da população-alvo das vacinas. Desta forma, a vacinação por vias mucosas tem ganho cada vez mais importância desde o início do século XXI, tanto pelos resultados positivos apresentados como pelas potencialidades e vantagens

que apresenta relativamente às vacinas convencionais, existindo neste momentos inúmeros estudos que se debruçam sobre este novo campo da imunologia e saúde humanas.^(54,55,56,57)

3.2.2.4.2. VACINAÇÃO POR VIAS MUCOSAS

A vacinação por vias mucosas tem sido o termo usualmente atribuído à produção de imunização que utiliza as vias oral, intranasal, pulmonar, retal e vaginal (entre outras) para a administração de vacinas. Combinadas, as mucosas do organismo humano perfazem uma superfície de cerca de 400 m^2 ⁽¹³⁾, sendo também essa uma das razões que fazem do sistema de mucosas a rota mais utilizada para a entrada de AP's.⁽⁵⁵⁾ No entanto, estas superfícies são também dotadas de um vasto e especializado sistema imunitário (designado por tecido linfático associado a mucosas) que confere determinada proteção contra toda a espécie de substâncias estranhas ao organismo (tanto patogénicas como inofensivas). De facto, uma das razões mais importantes que tem levado ao desenvolvimento da vacinação por vias mucosas é a evidência cada vez mais sólida de que a resposta imunitária a nível das mucosas contribui significativamente para a proteção contra várias doenças, principalmente naquelas que têm início nas mucosas (respiratórias, gastrointestinais, urogenitais).⁽⁵⁸⁾ Para além disso, as respostas imunológicas a nível das mucosas demonstram ser mais eficientemente induzidas pela vacinação por vias mucosas do que as vacinas convencionais, que são geralmente fracos indutores de respostas imunitárias a nível das mucosas e, por isso, menos eficientes a impedir o estabelecimento de patologias por via mucosa.⁽⁵⁸⁾ No entanto, tem sido por vezes complicado estimular uma resposta imunitária consistente e que confira proteção a nível das mucosas pelo método da vacinação por vias mucosas na prática clínica, razão pela qual se verifica que são poucos os exemplos de vacinas por via mucosa aprovadas para uso humano (apenas contra infeções por rotavírus, cólera, poliomielite, febre tifóide e *influenza*).⁽⁴⁾

Considerando que as mucosas constituem os locais por onde entram a maioria dos AP's, então a proteção contra esses AP's será mais eficiente se estiverem presentes Ac's nas mucosas e secreções locais, ao invés de estarem apenas presentes no soro (a nível sistémico). Alguns autores consideram até que a IgAs previne mais eficientemente a colonização das mucosas e a entrada na corrente sanguínea de microrganismos patológicos, em comparação com a ação desenvolvida pelos Ac's sistémicos neste aspeto.⁽⁵⁹⁾ Por outro lado, a indução de imunização a nível das mucosas não parece ser possível através da administração subcutânea ou intramuscular (utilizadas pelas vacinas convencionais), pelo

que, para que ocorra essa imunização local, a administração do Ag deverá ser feita através das mucosas que se encontram revestidas por tecido linfático associado a mucosas.⁽⁶⁰⁾

Acrescenta-se ainda que a administração de vacinas por vias mucosas (particularmente pela via oral) tem sido apontada como a via mais natural para a introdução de fármacos no organismo humano, para além de ser também a de mais fácil acesso e desprovida de inconvenientes apresentados pelas outras vias de administração (risco de infeção por agulhas contaminadas, efeitos hemolíticos ou dor durante a administração).⁽³⁾

3.2.2.4.3. VACINAÇÃO POR VIA ORAL

As vacinas orais (VO's) são uma tecnologia de saúde relativamente recente, mas com grande potencial para produzir imunização a nível das mucosas, sendo que algumas destas VO's constam já do plano de vacinação de alguns países.⁽⁴⁾

Para além das vantagens já referidas relativamente à vacinação por vias mucosas, a administração de Ag's por via oral apresenta melhores níveis de aceitação, nomeadamente pelas crianças e jovens, que são também considerados a população-alvo deste tipo de imunização. Acresce também o facto de não serem necessários profissionais de saúde especializados para a administração desta tecnologia, sendo este também um fator que facilita ações de vacinação em larga escala e num curto período de tempo. Outro aspeto fulcral das VO's relaciona-se com a sua capacidade de gerar tanto imunidade local como sistémica, embora em diferentes magnitudes.⁽³⁾ Porém, a vantagem que ganha cada vez maior destaque no atual panorama de crise mundial relaciona-se com os reduzidos custos operacionais apresentados por esta tecnologia. Este fator revela-se ainda mais preponderante atendendo a que, na maioria dos casos, estas VO's visam imunizar o organismo humano contra doenças como a poliomielite, cólera e febre tifóide (entre outras), que têm uma maior incidência e prevalência em países subdesenvolvidos e, portanto, com menores recursos financeiros.⁽³⁾

Apesar de todas as vantagens apresentadas pelas VO's, existem alguns aspetos que limitam o sucesso desta tecnologia e que a comunidade científica tem vindo a tentar melhorar e modificar. Uma das desvantagens das VO's relaciona-se com estabilidade dos epítomos a nível do trato gastrointestinal (TGI), visto que as condições a este nível são bastante adversas (sobretudo para epítomos proteicos), podendo assim resultar na diminuição ou perda de imunogenicidade desses epítomos, sendo por isso necessárias

grandes doses de Ag para garantir uma resposta imunitária consistente. ⁽⁵⁵⁾ Outro inconveniente das VO's (relacionada, em parte, com a desvantagem anterior) prende-se com a necessidade de repetir a administração de grandes quantidades de Ag para garantir a eficácia e durabilidade da proteção conferida pelas VO's, situação que, naturalmente, irá resultar num aumento dos custos operacionais associados às VO's. ⁽⁶¹⁾ Outra dificuldade relativa a este meio profilático tem a ver com o desenvolvimento de tolerância imunológica (TI), ou seja, a diminuição da capacidade de desenvolver uma resposta imunitária face a uma exposição repetida ao mesmo Ag. Este fenómeno de TI é dependente da via de administração (por exemplo, as vias subcutânea e intramuscular não geram TI) e é vista como um dos principais desafios no desenvolvimento de VO's, tanto pelas várias hipóteses que levam à produção de TI como pela complexidade dos mecanismos que geram a mesma. ⁽⁶²⁾ Destacam-se também pela negativa a grande variabilidade na resposta e a enorme diversidade e dispersão de dados clínicos (por vezes contraditórios) que estão associados às VO's e que, desta forma, dificultam a sustentação científica para que muitas destas possam ser aprovadas e comercializadas para uso humano. Existem estudos que apontam algumas razões para esta grande variabilidade na resposta às VO's, como sejam a presença de Ac's maternos (via placenta ou leite materno) no organismo de recém-nascidos e bebés (que, desta forma, vão diminuir ou até inativar a ação pretendida das VO's) e a presença de microrganismos entéricos (tanto vírus como bactérias) que alterem o funcionamento e composição da flora intestinal. ⁽⁶³⁾ O facto de ainda não existir um sistema de libertação genérico e que se adeque a todas as formulações de VO's tem atrasado o desenvolvimento e até algum investimento neste tipo de tecnologia, a par de também ainda não estarem totalmente elucidados todos os aspetos relativos ao mecanismo de produção de imunidade a nível das mucosas. ⁽³⁾

Deste modo, é bastante evidente que a tecnologia das VO's precisa ainda de ser aprimorada em alguns aspetos, nomeadamente no que concerne aos sistemas de libertação, veículos e adjuvantes utilizados nas formulações das VO's, de modo a tornar esta tecnologia mais simplificada e mais acessível à escala global (mantendo, obviamente, baixos custos operacionais), especialmente nos países com menores condições financeiras e onde as doenças infecciosas são ainda a primeira causa de morte. ⁽³⁾

3.2.2.4.4. MECANISMO DE AÇÃO DAS VACINAS ORAIS

A par da sua função primordial de absorção de nutrientes, o TGI desempenha também um papel importante na interface entre o organismo humano e o ambiente externo. Dado que o TGI apresenta a maior densidade de microrganismos de que há registo em ecossistemas microbianos⁽⁶⁴⁾, não será surpreendente que este possua também um extenso e complexo sistema imunitário que produza mais Ac's que os produzidos pelo baço e linfonodos, contribuindo também para a produção da maioria da IgAs presente no corpo humano.⁽⁶⁵⁾ O tecido linfático associado ao intestino (composto pelas PP, apêndice e outros agregados linfáticos) desempenha, desta fora, um importante papel na manutenção da homeostasia a nível gastrointestinal. De entre os vários agentes envolvidos na resposta imunitária a nível do TGI destacam-se as células M (CM's), que são células especializadas do epitélio intestinal que fazem parte do designado epitélio associado a folículo que, por sua vez, recobre as PP's, que são estruturas foliculares linfáticas organizadas em nódulos ou agregados, localizados sob a *lâmina própria*. Existe ainda uma zona entre o epitélio associado ao folículo e as PP's apelidada de domínio subepitelial, onde se localizam células dendríticas, LB's virgens, LT_{CD4}'s, LT_{CD8}'s (em predominância) e macrófagos (ver *Figura 3.5*).

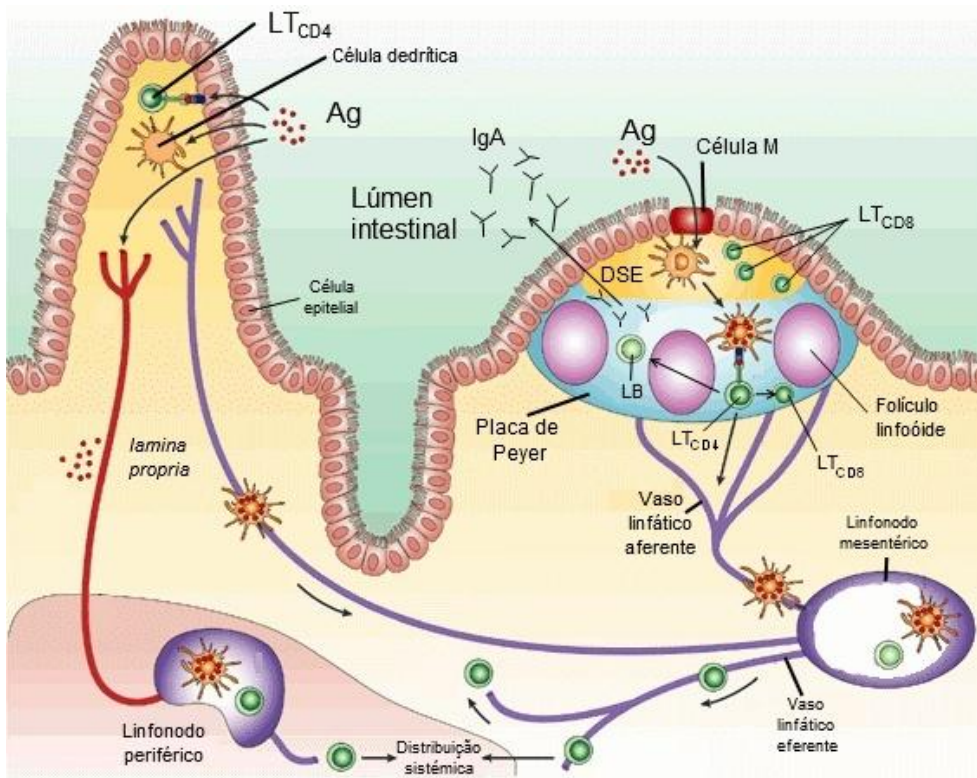


Figura 3.2.5 – Esquema da resposta imunitária local a nível da mucosa intestinal [adaptado de (66)].

Estruturalmente, as CM's não possuem microvilosidades na sua superfície apical (ao contrário das restantes células do epitélio intestinal), apresentam um glicocálice (matriz glicoproteica extramembranar) menos espesso, mas formam na mesma as uniões íntimas com as restantes células do epitélio intestinal, mantendo assim intacta a função barreira destas células, embora com diferentes características estruturais.⁽⁶⁷⁾ As CM's estão situadas em locais estratégicos do epitélio intestinal, permitindo assim a transcitose de uma variedade de Ag's (proteínas, vírus, bactérias e outras partículas não infecciosas) até às PP's, sendo por isso desprovida de lisossomas ou outras estruturas que possam comprometer a viabilidade imunogénica dos Ag's, permanecendo estes intatos.⁽⁶⁸⁾

As VO's utilizam precisamente esta propriedade das CM's para, desta forma, fazer chegar os seus Ag's até às CAA's (células dendríticas e macrófagos) que se localizam no domínio subepitelial. Estas CAA's, após processarem os Ag's, vão expressá-los na sua superfície, resultando desse processo a estimulação e ativação dos LB's e LT's das PP's, com conseqüente produção de Ac's (predominantemente do tipo IgAs) e indução de uma resposta imunitária a nível local. As IgAs migram através das células epiteliais até ao lúmen do intestino delgado, onde exercem a sua ação protetora contra microrganismos e outras partículas, através da inibição da aderência dos microrganismos às células epiteliais (prevenindo a sua colonização e proliferação), neutralização de toxinas bacterianas e atividade viral e através do bloqueio da absorção de Ag's a partir do intestino. Já os LT's exercem a sua função protetora através da migração destes até à *lamina própria* e epitélio intestinal (convertendo-se em LT_{CD8}) onde atuam diretamente na eliminação de Ag's/microrganismos, através de mecanismos citotóxicos. Os LT's que se diferenciam em LT_{CD4} assumem um papel de regulação da resposta imunitária, ao estimularem a proliferação de LT_{CD8}, LB's e LT's a nível local.^(6,69,70)

Sobre este processo, resta ainda fazer menção ao potencial que esta resposta imunitária local tem de gerar uma resposta imunitária sistémica, embora de fraca magnitude. O mecanismo pelo qual sucede este fenómeno não está ainda totalmente elucidado, mas pensa-se que é através da migração pelos vasos linfáticos aferentes de algumas células dendríticas (que apresentam determinado Ag à sua superfície) que atingem outros órgãos linfáticos (como os nódulos linfáticos e o baço), despoletando nesses locais uma resposta imunitária sistémica.^(58,71)

Outro aspeto com merecido destaque neste processo é a produção de TI que se verifica em alguns casos e que diminui drasticamente a eficácia das VO's. São três os mecanismos básicos implicados na tolerância induzida pelo Ag: a deleção clonal (em que

os linfócitos são eliminados por apoptose quando entram em contato com o Ag), a anergia clonal (em que os linfócitos com especificidade para o Ag são inativados, mas não destruídos) e a supressão ativa (em que os linfócitos deixam de reagir à presença do Ag, devido à ação de citocinas inibidoras produzidas por outros linfócitos). A dose de Ag influencia também a forma de TI que se desenvolve, visto que baixas doses de Ag favorecem o mecanismo de supressão ativa e doses mais elevadas favorecem a anergia e deleção. Também o peso molecular e hidrossolubilidade dos Ag's afeta a forma de TI desenvolvida, em que os Ag's com baixo peso molecular e hidrossolúveis induzem a anergia e deleção e os Ag's com elevado peso molecular e lipossolúveis induzem a supressão ativa ⁽⁷²⁾. Vários estudos têm demonstrado uma inequívoca influência do mecanismo de supressão ativa na indução de TI associados às VO's e, mais recentemente, também o mecanismo da anergia. Já relativamente ao mecanismo de deleção, existem ainda poucas evidências na sua associação com TI associada a VO's. ^(73,74,75)

4. NANOPARTÍCULAS NA ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS E VACINAS

A tecnologia dos sistemas de libertação de fármacos é vista como uma das novas fronteiras da ciência, dotada de uma forte componente multidisciplinar que tem demonstrado resultados apreciáveis na melhoria e evolução de tecnologias de saúde. Genericamente, estes sistemas oferecem inúmeras vantagens relativamente aos sistemas ditos convencionais: maior eficácia terapêutica (através da libertação progressiva e controlada do fármaco a partir da degradação da matriz), diminuição significativa da toxicidade, maior biodisponibilidade, administração segura (sem inflamação local, como se verifica nas vacinas convencionais), conveniente (menor número de doses) e não-invasiva (sem necessidade de utilizar via parenteral ou outra que possa provocar dano), maior direcionamento a alvos terapêuticos específicos e, por fim mas não menos importante, a possibilidade de administrar tanto substâncias hidrófilas como hidrófobas. ⁽⁷⁶⁾

Estas novas estratégias para a veiculação de fármacos incluem várias aplicações importantes da ciência de colóides, nas suas mais variadas formas (emulsões múltiplas e inversas, microgéis, nanogéis, lipossomas, micro e nanopartículas, micro e nanocápsulas) sendo os sistemas nanoparticulares aqueles que oferecem melhores condições e mais vantagens na formulação de sistemas de libertação de fármacos, nomeadamente a nível da formulação de vacinas orais. ⁽⁹⁾

A via oral é a via de administração de fármacos preferida, não só pelo seu caráter não-invasivo e pela facilidade de administração, como também por evitar a dor e desconforto decorrentes da via parenteral, bem como os resíduos sólidos resultantes (contaminantes) que requerem uma adequada inativação. No entanto, quando a composição do fármaco consiste em péptidos ou proteínas bioativas, este tem que manter a sua integridade e viabilidade por todo o TGI até alcançar o lúmen intestinal, onde necessita de permanecer durante um determinado período que seja suficiente para permitir a adesão às células epiteliais e garantir a sua transcitose até ao seu alvo terapêutico. Além do mais, os péptidos e proteínas possuem *per si* uma baixa biodisponibilidade oral, essencialmente devida à baixa permeabilidade apresentada por estas moléculas a nível das mucosas e pela instabilidade gastrointestinal, que resulta na sua degradação antes de ocorrer a absorção. Desta forma, foram vários os estudos que se focaram no desenvolvimento de sistemas de libertação de fármacos apropriados para péptidos e proteínas, bem como várias estratégias que possibilitassem o aperfeiçoamento desses sistemas de libertação de fármacos de modo a tornar a administração oral de fármacos e vacinas mais eficiente a nível terapêutico.^{(76) (9)}

Do ponto de vista farmacêutico, as nanopartículas (NP) têm vindo a despertar bastante interesse nos investigadores pelo facto de possibilitarem um incremento na biodisponibilidade de péptidos e proteínas. A escolha deste sistema em particular prende-se com a sua maior estabilidade a nível gastrointestinal relativamente a outros colóides, protegendo assim o fármaco/Ag do ambiente hostil do TGI. O facto de se poder modular as características físico-químicas, os perfis de libertação (*e.g.* controlada, prolongada, retardada) e o comportamento biológico (*e.g.* adesão, direcionamento, absorção celular) das NP através do seu revestimento com diversos polímeros também é um aspeto que tem despertado bastante interesse na comunidade científica. Acresce ainda que a dimensão submicroscópica e a vasta superfície das NP favorecem a sua absorção, comparativamente com sistemas de maiores dimensões.^(9,77,78)

Alguns autores têm referido que o sistema de libertação de vacinas ideal deveria ter em conta o fenómeno de maturação da afinidade (processo pelo qual os Ac's adquirem uma maior afinidade pelo Ag). Desta forma, o comportamento ideal de um sistema de libertação de vacinas deve mimetizar os perfis de concentração de Ag's que são observados aquando de uma infeção natural, ou seja, elevadas doses de Ag's nos primeiros dias da administração e depois uma redução gradual da quantidade de Ag's. A biodisponibilidade inicial de Ag's irá influenciar a magnitude da formação de LT_m's,

enquanto a subsequente diminuição de Ag's irá favorecer o desenvolvimento da maturação de afinidade dos Ac's. ⁽³⁴⁾

Neste contexto, os sistemas de libertação de vacinas mais estudados são as NP poliméricas, mais especificamente as que possuem caráter biodegradável. A encapsulação irá proteger o Ag do meio ácido e enzimas presentes no TGI, para além de assegurar uma cedência gradual do Ag, simplificando desta forma o esquema posológico das vacinas. Acresce ainda que estes sistemas contribuem para a simplificação e redução de custos associados à logística de produção, transporte, armazenamento e distribuição de vacinas. ⁽⁹⁾

4.1.AS NANOPARTÍCULAS E A SUA APLICAÇÃO NA IMUNIZAÇÃO ORAL

As NP são partículas coloidais sólidas cujo diâmetro varia entre 1 e 1000 nm, constituídas por macromoléculas (de origem sintética ou natural) com diferentes propriedades físico-químicas e com várias aplicações em diferentes áreas da ciência. Podem, por isso, ser utilizadas para fins terapêuticos, como adjuvantes de vacinas ou excipientes de fármacos, onde o princípio ativo pode ser dissolvido, encapsulado, adsorvido ou ligado quimicamente. Podem ainda ser utilizadas em terapia génica, como transportadores de ADN. ⁽⁷⁾

Existem dois tipos de nanopartículas, dependendo da sua estrutura: as nanosferas e as nanocápsulas. As nanosferas compõem-se de uma matriz onde os princípios ativos podem estar uniformemente dispersos ou adsorvidos à superfície, enquanto as nanocápsulas apresentam uma estrutura do tipo reservatório, estando os princípios ativos encapsulados no seu interior ou adsorvidos no exterior (*Figura 4.1*). ⁽⁷⁾

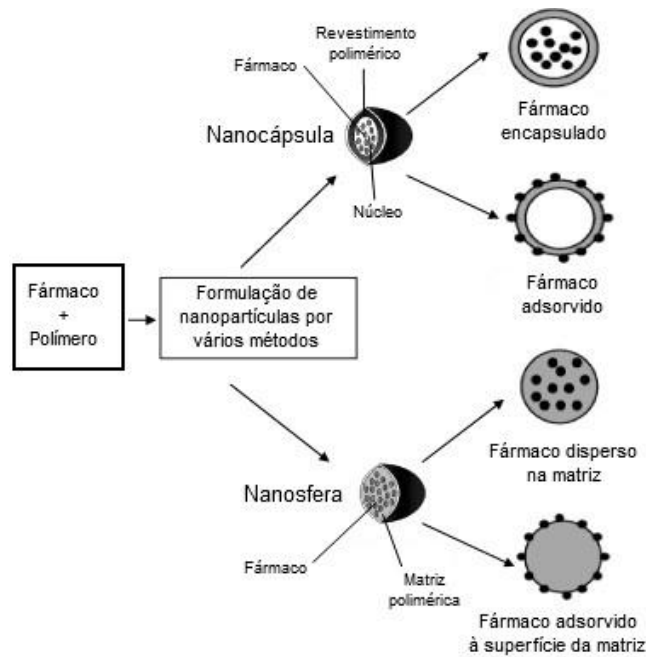


Figura 4.1 – Esquemática da estrutura de nanocápsulas e nanosferas [adaptado de (79)].

Como vem sido referido ao longo desta monografia, as formulações nanoparticulares apresentam várias vantagens relativamente aos outros sistemas coloidais (emulsões múltiplas e inversas, micro géis, nano géis, lipossomas, micropartículas e microcápsulas). Estas vantagens relacionam-se, desde logo, com a reduzida dimensão de partícula e elevada relação área superficial/volume.⁽⁸⁰⁾ As NP possibilitam ainda a modulação das características físico-químicas da sua superfície, possibilitando assim a utilização de uma enorme variedade de materiais e fármacos com diferentes propriedades físico-químicas, que podem ser transportados eficazmente até aos alvos terapêuticos.⁽⁸¹⁾ Em determinadas situações, é até exequível o direcionamento das NP até determinados tipos de células, tecidos ou órgãos, através da modulação da superfície destas, como referido anteriormente.⁽⁸²⁾ Acresce ainda o facto de as NP possuírem a capacidade de providenciar um melhor controlo da libertação do fármaco/Ag, bem como de permitir uma melhor captação e absorção destes pelas células epiteliais das mucosas, promovendo até, em alguns casos, a sua transcitose nos tecidos/células-alvo.⁽⁸⁴⁾ Por fim, acrescenta-se que os sistemas nanoparticulados podem providenciar a proteção do fármaco/Ag de ambientes que potenciem a sua degradação, através da encapsulação desse mesmo fármaco/Ag.^(7,82,83)

Apesar de todas as vantagens referidas anteriormente e dos extensos e inúmeros estudos experimentais, a utilização de NP no âmbito da administração de fármacos apresenta ainda alguns inconvenientes relacionados com a sua formulação, utilização e inativação. O maior problema destas formulações prende-se com um fenómeno designado

por floculação de partículas, em que as NP (ou outros sistemas coloidais) formam agregados espontâneos, perdendo desta forma grande parte das propriedades necessárias para o efeito desejado. Note-se que, apesar de cineticamente estáveis, os sistemas nanoparticulares apresentam somente uma meta estabilidade termodinâmica. O fenômeno da floculação depende das forças que atuam entre as partículas coloidais, sendo que esta ocorre quando as forças de atração entre partículas superam as forças de repulsão entre as mesmas. Desta forma, é necessário que o potencial zeta destes sistemas nanoparticulares não seja demasiado baixo para evitar o fenômeno da floculação de partículas, sendo que valores na ordem dos 30 mV (positivos ou negativos) são considerados suficientes para garantir a estabilidade do colóide. ^(7,85)

As condições e o tempo de armazenamento das NP também têm influência direta na sua posterior eficácia, visto que as NP dispersas em meio aquoso possuem baixa estabilidade físico-química, em períodos de armazenamento prolongados. As principais limitações são a agregação das partículas, a estabilidade química do polímero e/ou do Ag ou de outras matérias-primas e, por fim, a libertação prematura do Ag. Estas últimas limitações são também responsáveis pelos insucessos recorrentes na produção em grande escala de NP. ^(83,86)

Uma limitação/preocupação mais recente relativa a estas tecnologias tem sido a falta de estudos toxicológicos e ambientais que avaliem potenciais riscos da sua utilização. A questão da segurança dos nanoproductos tem ganho cada vez mais atenção em virtude do aumento do seu uso e da rápida comercialização de vários produtos que utilizam esta tecnologia, sem que exista regulamentação específica sobre a sua utilização. Importa salientar que os nanomateriais, em função da sua área superficial aumentada, poderão eventualmente causar efeitos tóxicos no organismo humano sem que haja manifestação aparente dos mesmos (ao contrário do que ocorre na generalidade dos efeitos tóxicos causados por macro materiais). Alguns investigadores concluíram também que a utilização de nanomateriais pode causar novos efeitos que nunca antes foram detetados com a utilização de macromateriais (*e.g.* danos mitocondriais, aumento/diminuição da agregação plaquetária, efeitos cardiovasculares). Não está claro, no entanto, quais são os riscos para o meio ambiente e seres vivos advindos de produtos manufaturados à escala nanométrica, tal como não é ainda compreensível se tais partículas, por serem extremamente pequenas, podem penetrar na cadeia alimentar, afetar as florestas e a qualidade do ar. A *Tabela 4.1* pretende resumir as diversas vantagens e desvantagens decorrentes da utilização de nanopartículas para a veiculação de fármacos/Ag. ^(87,88,89)

Tabela 4.1- Resumo das vantagens e desvantagens das nanopartículas na administração de fármacos/Ag.

Nanopartículas	
Vantagens	Desvantagens
Fácil modulação superficial	Perfil toxicológico pouco estudado
Elevada relação superfície/volume	Possível captação ou absorção por outras estruturas do organismo
Proteção do fármaco/Ag encapsulado	Capacidade de associação de fármaco/Ag limitada pelas reduzidas dimensões
Possibilidade de perfil de libertação controlado	Dificuldades no armazenamento e estabilidade coloidal
Possibilidade de direcionamento a determinados alvos terapêuticos	Dificuldades na produção em grande escala
Captação e absorção do fármaco/Ag melhoradas	Impacto ambiental desconhecido

A aplicação da nanotecnologia no desenvolvimento de vacinas orais tem-se revelado uma opção bastante atraente, visto que as funções fisiológicas dos organismos são baseadas em entidades com tamanhos na ordem dos nanómetros (*e.g.* material genético, compostos extracelulares, vírus). De facto, o tamanho das partículas carregadas com determinado Ag deve ser da mesma ordem de grandeza do tamanho dos AP's, de modo a serem elas também absorvidas e apresentadas por CAA's ao sistema imunitário da mucosa intestinal. Desta feita, pode-se considerar que o principal papel destes sistemas nanoparticulares é o de fazer chegar a maior quantidade de Ag viáveis (*i.e.* que mantenham os seus epítomos intactos e as suas características imunogénicas inalteradas) até aos tecidos linfóides responsáveis pela resposta imunitária da mucosa intestinal. A potência destes sistemas pode ainda ser melhorada mediante a utilização de imunopotenciadores, principalmente em formulações com Ag's de fraca imunogenicidade.^(80,90)

Existe uma grande variedade de materiais que são utilizados na formulação de NP (*e.g.* polímeros, lípidos, proteínas, metais), sendo necessário definir rigorosamente qual a carga, alvo e efeito que se pretende de determinada formulação para que se selecione o material mais apropriado na sua produção. As NP requerem materiais que sejam inertes, biocompatíveis e disponíveis com um grau de pureza farmacêutico, ocorrendo a libertação do Ag por via da degradação, erosão, dilatação ou difusão da NP, pelo que é igualmente importante que o material selecionado seja também biodegradável.⁽⁸⁰⁾ Deve também ser

tida em conta a estabilidade, eficiência de encapsulação e quantidade de material que pode ser incorporado na NP. Podem ser também necessárias outras características mais específicas e que resultam de especificidades da via de administração. No caso da via oral, é necessário ter em conta a permeabilidade e a viabilidade das NP nas condições fisiológicas do TGI. Tendo em conta todas estas especificidades e necessidades, a escolha do material para produzir as nanopartículas a utilizar recai, naturalmente, nos polímeros (tanto sintéticos como naturais), visto que estes possuem várias das características referidas anteriormente.^(91,92)

Além do mais, existe neste momento uma enorme quantidade de informação disponível relativamente à interação das células do sistema imunitário com os diferentes materiais utilizados (incluindo também os dotados de imunopotenciação), bem como dos princípios e mecanismos inerentes ao funcionamento do sistema imunitário, o que tem possibilitado a experimentação de várias combinações de diferentes materiais na formulação de adjuvantes de vacinas⁽⁸⁰⁾.

Relativamente à vacinação por via oral, as NP assumem duas responsabilidades primordiais: a de proteger os Ag's da degradação ao longo do TGI e a de aprimorar o direcionamento e captação pelo tecido linfático associado ao intestino. Desta forma, o constante aprofundamento do conhecimento relativo a estes dois aspetos poderá ser a chave para a formulação de vacinas orais cada vez mais eficientes.^(9,80)

Acrescenta-se ainda que outra característica desejada nos sistemas nanoparticulados para administração de vacinas orais tem a ver com a sua capacidade de comportar grandes quantidades de Ag. A associação do Ag pode ser efetuada por dois métodos: através da incorporação do Ag ainda no processo de formulação da NP ou através da adsorção de Ag após a formulação das NP, incubando as mesmas numa solução concentrada de Ag's. Estes dois métodos permitem a associação dos Ag's às NP através de várias formas. Assim, os Ag's podem ser encapsulados nas cavidades formadas após o arranjo do polímero (nanocápsulas), dispersos na matriz formada pelo polímero (nanosferas), adsorvidos à superfície das NP e/ou ligados quimicamente ao polímero. A quantidade de Ag que é associado às NP e o seu tipo de interação dependem da estrutura química do próprio Ag, da estrutura química do polímero e do método de associação utilizado.^(7,93)

O mecanismo pelo qual o Ag se liberta a partir da NP é também um fator a ter em conta aquando da formulação do polímero, dado que irá influenciar a eficácia e sucesso desta tecnologia. Em termos gerais, o rácio de libertação do Ag depende da própria solubilidade deste, do rompimento da ligação química com o polímero, da difusão através

da matriz do polímero e da degradação da própria NP. Foi também proposta a hipótese de a dimensão das NP ter influência no rácio de degradação do polímero, mas alguns investigadores elaboraram experiências com NP de diferentes dimensões e concluíram que, *in vitro*, não há nenhuma correlação entre a dimensão das NP e a degradação do polímero. No caso das nanosferas, a libertação ocorre por difusão a partir da matriz ou por erosão desta, dependendo da velocidade com que cada uma ocorre. ^(7,79,81,93)

No que concerne à dimensão das NP, as que possuem menores dimensões terão uma superfície maior, pelo que terão maior tendência a agregar (*i.e.* possuem menor estabilidade termodinâmica) e a libertar os Ag's mais precocemente (os processos de difusão/dissolução são mais rápidos devido à maior superfície de contato com o meio exterior) do que NP com dimensões maiores (logo, com núcleos maiores). Estas NP com maiores dimensões permitem tanto a incorporação de maiores quantidades de Ag como a libertação mais faseada destes, mas é necessário ter em conta que a dimensão afeta, como já foi referido, a captação das NP a nível das células epiteliais do intestino, pelo que a formulação de NP compreende sempre um desafio na procura do equilíbrio perfeito entre estas três vertentes (dimensão, estabilidade e capacidade de captação/absorção). Mais se acrescenta que a dimensão das partículas é usualmente aferida através das técnicas de espectroscopia de correlação fotónica ou por dispersão de luz. ^(7,85)

4.1.1. PRINCÍPIOS DE FORMULAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

Como referido anteriormente, as NP poliméricas têm sido o grupo mais estudado no âmbito da imunização, o que se deve essencialmente à sua flexibilidade, que permite uma fácil modulação das características físico-químicas. Estas NP podem ter por base polímeros de origem natural ou sintética, existindo vários métodos de produção em cada caso, os quais apresentam como grande variável o facto de se partir de um polímero pré-formado ou de se realizar uma polimerização. Muitos são os materiais poliméricos que têm sido reportados para a produção de sistemas nanoparticulados, demonstrando o seu potencial como transportadores de fármacos, com diferentes propriedades e vantagens específicas. ⁽⁹⁾
⁽⁸²⁾ ⁽⁸³⁾ No entanto, os materiais mais estudados com aplicações farmacêuticas para utilização em vias mucosas são os polímeros à base de ácido poli (lático-glicólico), ácido polilático, polietilenoglicol, policaprolactona e quitosano. Outros polímeros biodegradáveis naturais como a albumina, o colagénio e a hemoglobina têm também sido

estudados, mas apresentam limitações relativas aos seus elevados custos de purificação e aquisição. ^(76,77,82)

Os polímeros naturais (*e.g.* albumina, alginato, quitosano) apresentam vantagens que incluem a sua maior propensão para apresentar biodegradabilidade e biocompatibilidade, que são requisitos obrigatórios dos sistemas de administração de fármacos. Além disso, em alguns casos apresentam ainda caráter bioadesivo, o que confere grande capacidade de interação com as mucosas. As NP que têm por base polímeros naturais são maioritariamente produzidas por métodos de gelificação iônica e coacervação. Estes métodos apresentam a vantagem de serem suaves e isentos de solventes, fatores que podem ser determinantes para a manutenção das características do fármaco/Ag a ser incorporado nestas NP. Mais se acrescenta que a escolha do polímero deve ter em conta não só o objetivo e alvo terapêuticos como também a biocompatibilidade e perfil de degradação do polímero em condições fisiológicas. ⁽⁹⁾

As propriedades apresentadas pelas NP dependem de vários fatores, incluindo os parâmetros selecionados para a própria formulação. Aspectos como a concentração de fármaco/Ag e o peso molecular do polímero demonstram ter influência direta no tamanho de partícula, neste último caso verificando-se que a menor peso molecular correspondem NP menores e menos dispersas. ^(9,94,95,96,97)

As propriedades da superfície das NP também influenciam a extensão da absorção a nível intestinal das próprias NP ou do Ag encapsulado/adsorvido nestas. Já a lipofilia e a carga superficial são, por sua vez, largamente influenciadas pela composição do polímero. No entanto, a superfície das NP pode ser modificada e modulada de forma a adquirir as propriedades desejadas, de modo a atingir com maior eficácia o alvo terapêutico. Apesar de não haver ainda um consenso sobre as características superficiais ideais, é assumido que estas desempenham um papel fulcral no processo de absorção das NP/Ag a nível das células do epitélio intestinal (tanto nos enterócitos como nas CM). Desta feita, várias estratégias têm sido desenvolvidas no sentido de melhorar a absorção a nível da mucosa intestinal, seja pela modificação das suas características superficiais ou pelo acoplamento superficial de ligandos específicos. ⁽⁹⁾

A modificação da superfície das NP pode ocorrer através do revestimento destas com estabilizadores hidrofílicos, polímeros bioadesivos ou surfactantes, podendo realizar-se também pela incorporação na formulação de copolímeros biodegradáveis que contenham componentes hidrofílicos na sua formulação. Estas modificações alteram o potencial zeta (*i.e.* o potencial eletrocinético à superfície) e a lipofilia das NP e,

consequentemente, a estabilidade da formulação, propriedades de mucoadesão e adsorção e a absorção oral de NP. Devido às suas apreciáveis propriedades mucoadesivas, o quitosano tem sido o polímero mais utilizado para revestir a superfície de NP sendo que, atualmente, o principal objetivo deste tipo de modificação é o de melhorar o transporte de NP/Ag até e através da mucosa intestinal, por meio de interações específicas entre estes transportadores e as células epiteliais intestinais. ^(9,98)

A estratégia que se refere ao acoplamento de ligandos à superfície das nanopartículas tem o objetivo de proporcionar um direcionamento específico até aos recetores expressos nas células do epitélio intestinal. Várias moléculas têm sido estudadas para este fim, sendo a família das lecitinas a mais frequentemente visada. A grande vantagem desta estratégia assenta na grande variedade de ligandos (e, consequentemente, de diferentes características e propriedades) que podem ser acoplados à superfície das NP. ^(9,99,100)

4.1.2. TRANSPORTE DE NANOPARTÍCULAS ATRAVÉS DA MUCOSA INTESTINAL

No contexto da atual monografia, as nanopartículas desempenham um papel crucial no transporte dos Ag's até aos alvos terapêuticos. Até atingir a mucosa intestinal, as nanopartículas precisam de percorrer um longo e atribulado caminho pelo trato gastrointestinal, sendo que a eficácia do tratamento irá depender, em parte, da eficiência com que esse transporte é realizado. Já a absorção de NP/Ag's a nível da mucosa intestinal tem sido largamente abordada por numerosos estudos ao longo dos últimos anos. Atendendo a todas as vantagens apresentadas pela via oral (já referidas anteriormente), têm sido feitos vários esforços no desenvolvimento e aperfeiçoamento de formulações orais e na sua subsequente absorção a nível da mucosa intestinal. ^(9,101)

No entanto, existem dois aspetos fulcrais que limitam a investigação desenvolvida em torno desta tecnologia. O primeiro aspeto prende-se com o desconhecimento da quantidade de Ag que atinge a corrente sanguínea com capacidade de produzir o efeito terapêutico desejado. O segundo aspeto tem a ver com a fiabilidade da extrapolação de resultados experimentais de modelos animais para o organismo humano, dado que a maioria dos estudos que avalia o transporte de NP/Ag através da mucosa intestinal se efetua em organismos de animais, sendo por isso difícil de avaliar a eficiência dessas formulações no organismo humano. ^(9,102)

Em teoria, as partículas podem atravessar o epitélio intestinal pela via paracelular (*i.e.* pelas uniões íntimas, situadas entre duas células epiteliais adjacentes) ou pela via transcelular (*i.e.* através das células do epitélio intestinal), sendo que a última tem sido a mais explorada pelos investigadores (Figura 4.2).

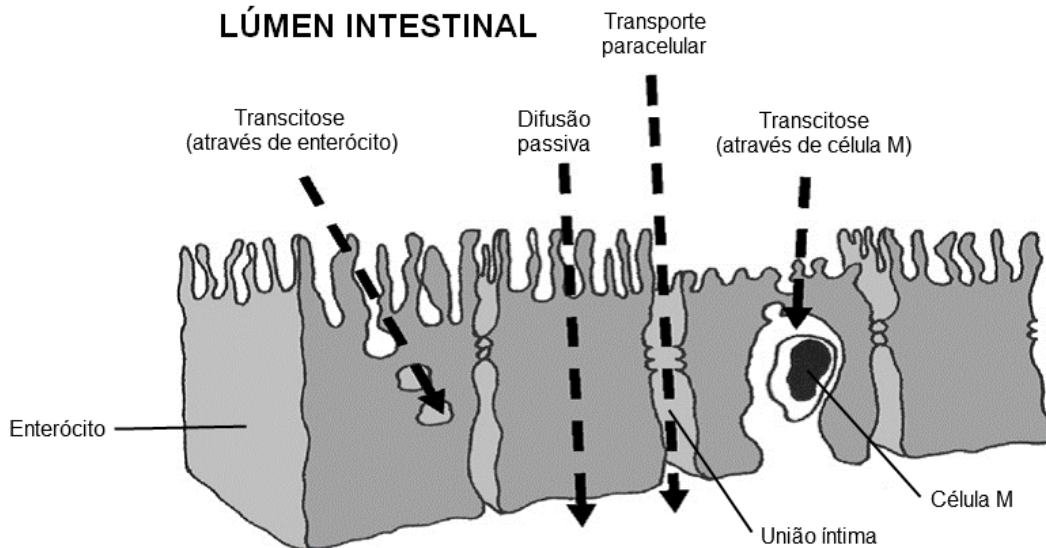


Figura 4.1.2 – Esquema do transporte de partículas através do epitélio intestinal [adaptado de (9)].

Em condições fisiológicas, a via paracelular é bastante limitada, tanto pela diminuta superfície dos espaços intercelulares como pelo carácter bastante apertado do percurso das uniões íntimas entre as células epiteliais (com um diâmetro entre os 3 e os 10 Å). Com o intuito de melhorar o transporte paracelular, foram realizados alguns estudos em que foram utilizados surfactantes para promover uma melhor absorção de fármacos/partículas por esta via. No entanto, o seu mecanismo de ação induzia danos irreversíveis no TGI, pelo que foi feita uma nova abordagem com a utilização de polímeros hidrossolúveis (*e.g.* quitosano, amido, polímeros tiolados), desta feita, com melhores resultados que os seus antecessores. Apesar do seu sucesso relativo, a atuação destes polímeros sobre as uniões íntimas resulta também numa acessibilidade indiscriminada de todo o conteúdo do TGI (incluindo toxinas e AP's) até à corrente sanguínea. Note-se que o aumento da acessibilidade desta via pode também resultar da ação das células dendríticas ou de determinadas patologias inflamatórias intestinais (como a doença de Crohn), mas sem benefícios acrescidos no que toca à veiculação de fármacos por esta via.^(9,103,104,105)

Relativamente à via transcelular, esta consiste no transporte de partículas (neste caso, NP) através de um processo de transcitose, em que as células do epitélio intestinal efetuam a endocitose de partículas através da membrana apical e a sua exocitose através da zona basolateral até ao domínio subepitelial (ver Figura 3.5). Do ponto de vista da

administração oral, os dois tipos de células que interessam são os enterócitos e as CM's, pois estes representam a maioria das células que recobrem o TGI, embora a proporção de CM's seja muito inferior à de enterócitos (cerca de 1% da superfície total do intestino, distribuídas maioritariamente e contiguamente às PP's). Mais recentemente, tem sido estudada e considerada a produção de vacinas orais direcionadas às células dendríticas, dado que estas são células especializadas na apresentação de Ag, demonstrando serem substancialmente responsáveis pelo desencadear de uma resposta imune adaptativa, através da internalização, processamento e apresentação do Ag pelo CMH I e II aos LT_{CD4+} e LT_{CD8+}.^(106,107)

Apesar de ainda existir alguma controvérsia, existem algumas evidências que demonstram que a transcitose pode ocorrer através dos enterócitos. Contudo, a quantidade de partículas absorvidas por esta via é geralmente muito baixa, como resultado da baixa atividade endocítica verificada nestas células, sendo que maioria das partículas é transcitada no epitélio associado ao folículo. Consequentemente, a comunidade científica tem centrado os seus esforços na investigação das estruturas que compõem o epitélio associado ao folículo, nomeadamente as CM's e os PP's.^(9,108)

O transporte de NP pela via transcelular depende de vários fatores, sendo os mais críticos as propriedades físico-químicas das NP's (dimensão, potencial zeta, lipofilia e presença de ligandos à superfície), a fisiologia intrínseca do TGI (*i.e.* as variações de permeabilidade, cujas causas foram já referidas anteriormente) e o modelo animal utilizado no estudo de transcitose. É consensualmente aceite que a transcitose de NP aumenta com a diminuição do diâmetro destas, sendo igualmente consensual que as NP que apresentam carga exibem uma biodisponibilidade oral mais baixa. Foi também demonstrada uma relação inversa entre a lipofilia das NP e transcitose, embora tenha sido verificado um aumento na permeabilidade através da mucina (constituente do muco com funções protetoras) com NP com carácter lipofílico. A questão do modelo animal utilizado nos estudos e as subsequentes extrapolações para o organismo humano são também consideradas de extrema importância, atendendo à grande variabilidade das propriedades das células intestinais verificada entre diferentes espécies, especialmente em relação às CM's. Contudo, e apesar da falta de estudos que possibilitem extrapolar corretamente a informação e dados recolhidos em modelos animais, têm sido arquitetadas (com sucesso) várias estratégias e métodos que permitem aprimorar a captação (tanto específica como inespecífica) de NP do lúmen intestinal até aos alvos terapêuticos, através dos enterócitos e CM's.^(9,101,102,109)

As estratégias desenvolvidas para a captação inespecífica de NP compreendem a adaptação do revestimento polimérico com o intuito de melhorar a captação das NP (através da modificação da mucoadesão, utilização de promotores de permeabilidade poliméricos e estabilizadores de formulação coloidal) e o acoplamento de ligandos ao revestimento polimérico com o objetivo de melhorar o processo de endocitose. O acoplamento de ligandos às NP aumenta significativamente o transporte destas através da mucosa intestinal, tanto pelo aumento das interações com o muco e/ou superfície das células epiteliais do intestino, como pela promoção da transcitose das NP. Já as estratégias específicas de captação de NP assentam, em linhas gerais, na modificação destas últimas pela acoplação de moléculas à sua superfície que demonstrem potencial de interagir especificamente com as células-alvo (enterócitos ou CM's), com o intuito de promover uma maior eficiência no transporte e absorção das NP por essas células.^(9,110)

Existem duas estratégias diferentes relativas ao direcionamento das NP até às células do epitélio intestinal. Uma dessas estratégias passa por dirigir as NP até aos inúmeros enterócitos existentes ao longo da mucosa intestinal (mas que possuem, como referido anteriormente, reduzida atividade endocítica), enquanto a outra estratégia tenta maximizar a transcitose através das CM's, utilizando ligandos com especificidade para essas células.^(9,110)

Relativamente à estratégia que visa o direcionamento das NP até aos enterócitos, a abordagem mais popular passa pela utilização de lectinas (com diferentes propriedades e especificidades). Aglutininas do gérmen de trigo, concanavalina A e a toxina lábil de *E. coli* são exemplos de lectinas utilizadas para o efeito. No entanto, a utilização crónica destes compostos (conhecidos também pelas suas propriedades altamente imunogénicas) podem despoletar uma resposta inflamatória e irritação a nível do TGI, para além de se revelarem também citotóxicas para o organismo. Existem também formulações de NP que utilizam uma associação de quitosano e glucomanano, que conferem a vantagem de estabilizar as NP face aos fluidos gastrointestinais, ao mesmo tempo que facilitam as interações das NP com os recetores de manose dos enterócitos.^(9,111,112)

Embora as CM's estejam em menor proporção no TGI humano e apresentem uma enorme variabilidade (tanto a nível de espécies diferentes como a nível da mesma espécie, em dependência do próprio indivíduo e da sua situação fisiológica), a sua habilidade em transitar eficientemente partículas tem convencido vários grupos de investigadores a delinear algumas estratégias que visam o desenvolvimento e direcionamento de NP a este tipo específico de células intestinais. O direcionamento das NP até às CM's é de extrema

importância, visto que é desta forma que se tenta compensar o facto de estas células constituírem apenas 1% da superfície total do intestino. No entanto, esta tarefa tem-se revelado complicada por não existir um marcador específico das CM's, sendo utilizado um ligando (UEA-1) com elevada especificidade para a α -L-fucose presente nas membranas apicais das CM's de roedores, mas não nas CM's de humanos. No entanto, existem alguns estudos que apontam a especificidade de algumas lectinas (como as derivadas de *Sambucus nigra* e *Viscum album*) para as CM's humanas, apresentando assim potencial para serem usadas como ligandos na formulação de NP.^(9,113,114)

Outra estratégia para direccionar as NP até às CM's prende-se com a mimetização do comportamento de alguns AP's (como algumas espécies de *Yersinia*, *Salmonella* e *Shigella*) que conseguem invadir a mucosa intestinal através das CM's atingindo o sistema imunitário local da mucosa. Estes AP's apresentam à sua superfície estruturas microbianas (adesinas) que são responsáveis pela ligação e internalização do AP pelas CM's, pelo que alguns investigadores combinaram extratos de *Salmonella* com NP poliméricas, administrando-as de seguida *per os* a roedores, observando que essas NP foram amplamente distribuídas pelas PP's.^(9,115)

Existem ainda outros ligandos passíveis de direccionar as NP até às CM's, embora com menor expressividade. Um exemplo desses ligandos são as Ig's (particularmente a IgA) que podem ligar-se especificamente à superfície das CM's, facilitando a absorção das NP revestidas por esta categoria de moléculas.^(9,116)

Também o gangliosídeo M1 (recetor ubiquitário e presente no ápice da maioria das células intestinais) tem sido visto como um possível alvo para o direccionamento de NP, visto que este recetor apresenta especificidade para a subunidade B da toxina da cólera (porção sem toxicidade). Dado que este recetor está presente tanto em enterócitos como em CM's, o revestimento de NP com a toxina referida anteriormente pode conferir alguma especificidade para o direccionamento dessas NP até às CM's, visto que estas apresentam um glicocálice menos espesso, estando assim estes recetores de gangliosídeo M1 mais acessíveis às NP. Para além deste recetor, vários outros têm sido estudados como novos alvos para direccionamento de NP.^(9,117,118)

A *Figura 4.3* pretende resumir as várias abordagens que foram referidas anteriormente com o intuito de melhorar a absorção de NP por parte das células epiteliais do intestino.

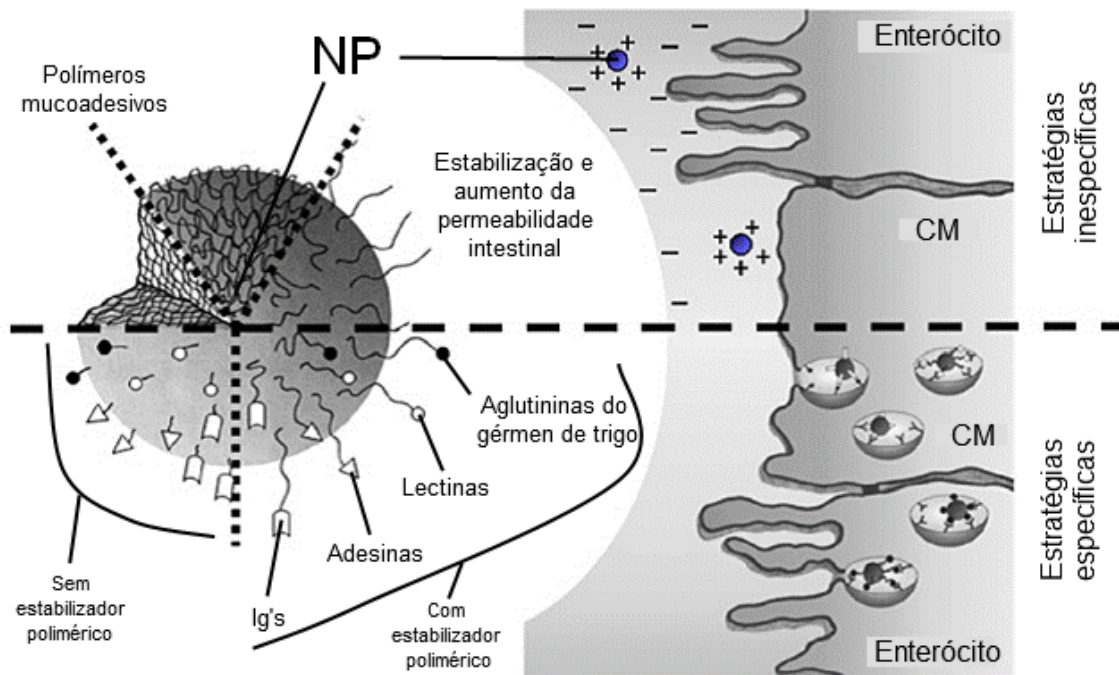


Figura 4.1.3 - Resumo das estratégias de aperfeiçoamento da absorção das NP a nível do TGI [adaptado de (9)].

4.2. NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO PARA IMUNIZAÇÃO ORAL

O quitosano é um polímero de origem natural constituído por unidades de *N*-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina (estando a última em maior proporção) e pode ser obtido naturalmente a partir de fungos (dos géneros *Mucor* e *Zygomycetes*) ou, mais comumente, por via da desacetilação alcalina da quitina, tida como o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (a seguir à celulose) e presente no exosqueleto de crustáceos e insetos (ver *Figura 4.4*). O grau médio de desacetilação (parâmetro que mede a extensão da reação de *N*-desacetilação da quitina) determina a obtenção de moléculas de quitosano com diferentes características físico-químicas (*e.g.* solubilidade, viscosidade, pKa).⁽¹¹⁹⁾ No entanto, é difícil obter quitosano com um elevado grau médio de desacetilação, visto que a degradação do polímero aumenta com o aumento do seu grau médio de desacetilação (geralmente, este situa-se entre os 30% e os 95%). No entanto, é desejável que o quitosano apresente um elevado grau de desacetilação (geralmente, superior a 60%), de modo a possibilitar uma melhor modulação das suas propriedades físico-químicas, seja pelo seu revestimento com outro(s) polímero(s) ou pela sua modificação química, produzindo assim derivados de quitosano com propriedades específicas para determinadas aplicações.^(119,120,121,122,123)

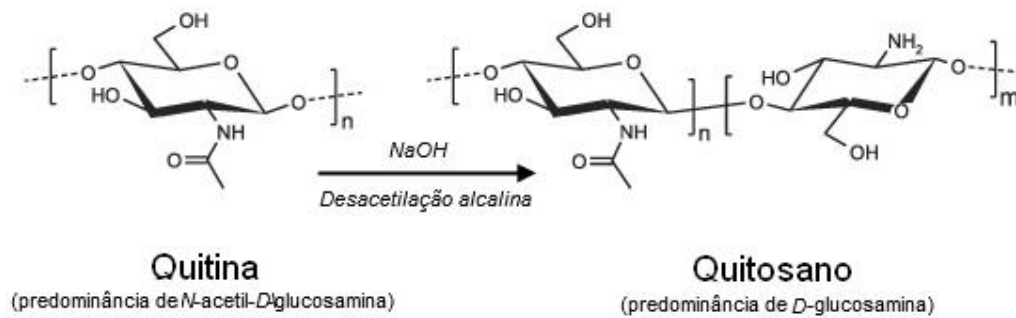


Figura 4.2.4 - Representação das estruturas químicas da quitina e quitosano [adaptado de (120)].

Um aspeto relevante na utilização de quitosano relaciona-se precisamente com a sua produção a partir da quitina. Como referido anteriormente, a quitina é encontrada em abundância em crustáceos, insetos e alguns fungos, mas a maior fonte deste polissacarídeo é proveniente das indústrias de transformação de alimentos extraídos do mar. O material não comestível (*i.e.* cascas, carapaças e outros) é, na grande maioria das vezes, considerado como desperdício e descartado no processo de transformação, o que torna a aquisição de matérias-primas extremamente barata. Porém, é importante realçar que a extração dos constituintes com interesse económico deve ser realizada de forma adequada e garantir, no final do processo, a obtenção de quitosano com um elevado grau de pureza e isento de contaminantes (*e.g.* proteínas, endotoxinas, metais tóxicos).^(120,124)

Tanto a quitina como o quitosano são considerados materiais biologicamente compatíveis com o organismo humano, não apresentando também riscos acrescidos para o meio ambiente. Além do mais, apresentam um rol de características e vantagens que possibilitam a sua utilização em várias áreas científicas e industriais, tais como a inexistência de toxicidade, biodegradabilidade, polifuncionalidade, elevada reatividade química, quiralidade, propriedades quelantes e alto poder de adsorção (conferido pela alta hidrofília, presença de vários grupos funcionais e flexibilidade da cadeia polimérica). O maior problema relacionado com a extração da quitina resulta do seu modo de preparação, pois é difícil de obter quitina com as mesmas características dos lotes sintetizados anteriormente, nomeadamente no que concerne à sua massa molar e grau de acetilação. Desta forma, o polímero obtido deve ser devidamente caracterizado quanto à sua massa molar, grau de desacetilação e distribuição dos grupos amina e acetilo ao longo da cadeia, visto que estas características podem influenciar a biodegradabilidade do mesmo, principalmente na acessibilidade enzimática, influenciando assim a hidrólise do polissacarídeo.^(120,124,125)

Vários autores referem grandes variações nas propriedades físico-químicas e biológicas do quitosano, muito devido à sua forma de obtenção, origem das matérias-primas, modo de preparação, temperatura e tempo de secagem, entre outros. Relativamente à solubilidade do quitosano, é de salientar que este polissacarídeo apenas solubiliza em soluções aquosas de caráter ácido, dado que a sua constante de dissociação ácida (pK_a) ronda os 6,5. Desta forma, o quitosano apresenta-se insolúvel em meios cujo pH seja superior a 6,5 (*e.g.* água, alguns fluidos corporais) apresentando também esta característica em solventes orgânicos e algumas bases diluídas. Porém, em soluções aquosas com caráter mais ácido, este polímero apresenta uma solubilidade crescente, resultante da protonação dos grupos amina da cadeia polimérica pelo que, em soluções com pH entre 1 e 2, o quitosano apresenta-se totalmente solúvel. Note-se que a solubilidade do quitosano depende não somente do grau médio de desacetilação mas também da distribuição dos grupos acetilo ao longo da cadeia principal e da massa molar do polímero. Deve-se ter também em conta que a desacetilação, usualmente efetuada no estado sólido, confere uma estrutura irregular ao polímero final, devido ao caráter semicristalino do polímero inicial.^(123,126,127,128)

O quitosano apresenta ainda várias propriedades biológicas com relevante interesse medicinal, ao apresentar propriedades fungicidas e fungistáticas (com interesse para a indústria de cosméticos), antimicrobianas e bacteriostáticas (através de interações com as membranas dos microrganismos), hemostáticas (efeito coagulante, ao reduzir o tempo de coagulação, o que se reflete também numa cicatrização mais rápida), dietéticas (efeito hipocolesterolémico e hipolipidémico e contribuição na redução de peso), analgésicas (ao interferir positivamente nos processos inflamatórios) e, por fim, regenerantes (regeneração óssea e tecidual).^(120,123,127)

Este polissacarídeo tem sido largamente utilizado no desenho de sistemas de libertação de fármacos de natureza micro e nanoparticular devido às suas vantagens em relação a outros materiais. Estas vantagens devem-se, essencialmente, à sua maior estabilidade relativa, menor toxicidade e métodos de produção mais simples e suaves, que evitam a utilização de elevadas temperaturas e solventes orgânicos com potencial toxicidade que poderiam danificar a estrutura e atividade terapêutica do fármaco. Este último aspeto é particularmente importante na formulação de vacinas, visto que a desnaturação e/ou inativação do Ag resultaria numa perda de eficácia terapêutica da formulação. Acrescenta-se ainda que a utilização deste polímero permite uma elevada eficácia de encapsulação, comparativamente com outros polímeros.^(10,129)

Um outro aspeto vantajoso para a sua utilização do quitosano na administração de fármacos é relacionado com a sua característica mucoadesiva, como comprovado em vários estudos decorridos *in vitro*. Esta adesão do quitosano às mucosas ocorre devido a mecanismos de hidratação, interações iónicas e pontes de hidrogénio permitindo desta forma um maior tempo de contato entre o fármaco/Ag e a mucosa intestinal, o que resulta num aumento da biodisponibilidade desse fármaco/Ag.⁽¹²⁷⁾ Existem vários fatores que afetam as propriedades mucoadesivas do quitosano. A composição do muco pode ser um deles, dado que o seu componente principal (mucina) é rico em cargas substâncias de carga negativa, nomeadamente originárias do ácido siálico, o que promove interações de carácter electrostático entre o muco e o quitosano a nível do estômago, onde o quitosano se encontra carregado positivamente. Desta forma, a extensão desta interação entre o muco e o quitosano depende da quantidade de ácido siálico presente na mucina e do grau de desacetilação do quitosano.⁽¹³⁰⁾ Também o pH, peso molecular e grau de desacetilação influenciam a mucoadesão do quitosano. As interações são mais fortes quando os níveis de pH são mais baixos (situação em que o quitosano está positivamente carregado) e quando as cadeias poliméricas são mais longas (logo, com maior peso molecular e mais grupos carregados), visto que conseguem penetrar mais eficazmente na camada mucínica. As interações demonstram também ser mais fortes quando o quitosano apresenta um maior grau de desacetilação dado que, nestas condições, existe uma maior densidade de carga proveniente dos grupos amina livres.^(129,131)

A utilização do quitosano em sistemas de libertação de fármacos possibilita também um aumento da permeabilidade das junções estreitas (aumentado desta forma a eficiência do transporte paracelular), o que conduz a um aumento da absorção do fármaco pela via transcelular. Acrescenta-se ainda que o quitosano tem demonstrado possuir uma atividade imunoestimuladora, através da estimulação e ativação de macrófagos e linfócitos, promovendo assim uma maior magnitude na resposta imunitária a nível local.⁽¹³²⁾ Estas últimas propriedades justificam a vasta utilização deste polímero como adjuvante (substância que promove o aumento de imunogenicidade dos Ag's) na formulação de vacinas por vias mucosas.^(133,134)

Apesar de todas as vantagens inerentes à utilização do quitosano, este apresenta algumas limitações que podem influenciar a eficácia do sistema de libertação. Uma dessas limitações é a baixa solubilidade a pH fisiológico (7,4), limitando desta maneira o seu efeito promotor de absorção na veiculação de fármacos que utilizam a via oral ou nasal. Outra limitação do quitosano prende-se com a sua utilização em sistemas de libertação

controlada visto que este polímero adsorve muito rapidamente água, o que poderá resultar numa libertação mais rápida e prematura do fármaco/Ag. A *Tabela 4.2* pretende resumir as vantagens e desvantagens decorrentes da utilização do quitosano na formulação de nanopartículas.⁽¹³⁴⁾

Tabela 4.2 - Resumo das vantagens e desvantagens do quitosano na formulação de nanopartículas

Quitosano	
Vantagens	Desvantagens
Biocompatível e biodegradável	Insolúvel a pH fisiológico
Propriedades imunoestimulatórias	Libertação prematura do fármaco/antigénio
Baixo custo de aquisição e transformação	Aumento de permeabilidade desmesurado pode promover a entrada de organismos patogénicos
Propriedades mucoadesivas e de aumento da permeabilidade de mucosas	
Formulação de nanopartículas por métodos suaves e isentos de compostos orgânicos	

Para tentar contornar as limitações referidas anteriormente, os investigadores têm elaborado algumas modificações químicas na molécula de quitosano, sendo que a maioria incide nos grupos amina livres e nos grupos hidroxilo. A investigação em torno do quitosano não se limita apenas à sua forma desacetilada da quitina. Um elevado número de derivados de quitosano tem sido obtido através de inserções de novos grupos funcionais e de modificações químicas (como a quaternização, acilação, tiolação, entre outras) que permitem a produção de um vasto leque de derivados de quitosano com diferentes especificidades, para serem utilizados em várias aplicações nas áreas da biomedicina e biotecnologia. Note-se que estas modificações não afetam a estrutura fundamental da molécula de quitosano, mas possibilitam o melhoramento de algumas propriedades (*e.g.* mucoadesão e indução de permeabilidade) deste polímero e/ou até a aquisição de novas propriedades, permitindo assim o desenho de derivados de quitosano para fins e aplicações específicas. A capacidade do quitosano suportar facilmente estas modificações é também vista como uma vantagem em relação a outros polissacarídeos, nos quais é mais difícil de efetuar estas modificações estruturais com sucesso. Acresce ainda o facto de o quitosano ser também utilizado em revestimentos de nanopartículas, contribuindo assim para um melhoramento das características mucoadesivas destas e, conseqüentemente, num aumento do efeito terapêutico do fármaco/Ag encapsulado.^(84,133) O *N*-trimetilquitosano é um

exemplo de um derivado de quitosano que apresenta uma melhor solubilidade a pH fisiológico, sendo até utilizado como veículo no transporte transmembranar de genes, apresentando inclusive melhores resultados que o quitosano, ao mesmo tempo que mantém as propriedades de biocompatibilidade, alta eficiência de associação e promoção de permeabilidade. No entanto, este derivado tem a grande desvantagem de proporcionar a libertação precoce do Ag, fenômeno que compromete drasticamente a sua subsequente biodisponibilidade e eficácia da vacina oral.⁽¹³⁵⁾ Outro derivado de quitosano utilizado em alguns ensaios é o mono-*N*-carboximetilquitosano, tido como promotor de absorção intestinal de macromoléculas aniônicas, como a heparina de baixo peso molecular.⁽¹³⁶⁾ Também os conjugados de quitosano (*i.e.* moléculas de quitosano conjugadas com excipientes bioativos) possuem características interessantes em aplicações para administração oral, visto que mantêm quase todas as características do quitosano e possibilitam ainda a adição, por exemplo, de um composto inibidor enzimático que exerça uma inibição enzimática local, protegendo assim o Ag da ação de enzimas hidrolíticas como, por exemplo, a tripsina e a quimiotripsina.⁽¹³⁷⁾

Por fim, resta referir que é também necessário efetuar um apertado controle de qualidade de todo o processo, em especial da matéria-prima sobre a qual vai ocorrer a modificação química, de modo a garantir o sucesso, eficácia e segurança do produto final.⁽¹³⁴⁾

Relativamente às nanopartículas de quitosano, estas foram pela primeira vez sintetizadas em 1997, por Alonso e colaboradores. Desde então, as nanopartículas de quitosano têm sido estudadas e experimentadas em várias aplicações, sendo uma dessas a veiculação de vacinas por via oral.⁽¹³⁴⁾

Dos vários sistemas coloidais que existem à disposição dos investigadores, as NP foram as que despertaram mais interesse em aplicações imunológicas por apresentarem várias características vantajosas relativamente aos restantes sistemas, já descritas anteriormente nesta monografia. Dessas, destacam-se novamente a habilidade de protegerem o Ag da degradação ao longo do TGI, a capacidade de promoverem o transporte paracelular e a transcitose até às PP's e a possibilidade de desenhar perfis de libertação controlada dos Ag's encapsulados. De entre os sistemas nanoparticulados, os que eram compostos por quitosano (ou derivados deste) foram também ganhando importância no panorama científico por apresentarem diversas vantagens (também já referidas anteriormente), das quais se destacam a promoção de absorção de fármacos/Ag's

por via oral, a elevada eficiência de encapsulação, o seu favorável perfil toxicológico e a sua capacidade imunoestimulante. ⁽¹¹⁾

São vários os estudos e ensaios elaborados com nanopartículas de quitosano (ou derivados deste) que demonstram inequivocamente os benefícios acrescidos da utilização deste sistema em concreto. ⁽¹¹⁾ Acrescem, desde logo, os resultados positivos de vários estudos elaborados com micropartículas de quitosano e que deixaram antever um futuro promissor para a utilização das nanopartículas de quitosano, dado que estas possuem menores dimensões e, conseqüentemente, melhor habilidade para serem absorvidas a nível das células epiteliais do intestino. ^(135,138,139)

As vacinas por vias mucosas têm apresentado alguns resultados considerados decepcionantes, atendendo às expectativas iniciais que foram construídas em torno da aplicação desta tecnologia, devido a vários fatores já referidos anteriormente. A utilização de nanopartículas de quitosano pretende, precisamente, contornar alguns desses inconvenientes, ao possibilitar uma encapsulação mais eficiente dos Ag's e, por outro lado, proteger os Ag's das condições adversas do ambiente gastrointestinal e da ação de enzimas hidrolíticas. Nos casos em que as nanopartículas de quitosano apresentam pouca porosidade, os Ag's são preferencialmente adsorvidos à superfícies das mesmas, o que pode provocar alguns problemas de estabilidade destes últimos. Nestes casos, é feito um revestimento adicional que protege as nanopartículas de quitosano com Ag adsorvido do ambiente ácido do TGI, utilizando polímeros resistentes a pH baixo, como por exemplo o alginato de sódio. Note-se que, apesar de este revestimento alterar a carga superficial (o alginato de sódio apresenta caráter negativo), a hidrofília e a capacidade de absorção pelas células do epitélio intestinal das nanopartículas de quitosano /Ag revestidos não apresentam alterações significativas. ⁽¹⁴⁰⁾

Existem já alguns exemplos concretos de estratégias e aplicações farmacêuticas das nanopartículas de quitosano em vias mucosas, embora para outras finalidades que não a imunização. Um desses exemplos é a utilização de nanopartículas de quitosano contendo ciclosporina A (encapsulada) que demonstrou ter uma absorção melhorada em modelos animais, comparativamente com o seu comparador ativo composto de uma microemulsão (Neoral®). ⁽¹⁴¹⁾ As nanopartículas de quitosano demonstraram também ser um veículo adequado para executar transferência de genes (transfeções), deixando antever algumas aplicações em terapia génica. Este potencial foi documentado em experiências que envolveram a encapsulação de um gene *mEpo* (que codifica a eritropoietina), o que permitiu a proteção deste gene das ADNases, o que resultou no aumento transitório (uma

semana) do hematócrito dos ratos em que estas nanopartículas de quitosano foram administradas oralmente. ⁽¹⁴²⁾ Esta tecnologia provou também ser útil na veiculação de insulina por via oral, obtendo resultados também promissores, dados os níveis hipoglicémicos que ocorreram nos ratinhos em que foram administradas estas nanopartículas de quitosano. Esta última descoberta poderá ser vista como um ponto de partida para o desenvolvimento de dispositivos de administração de insulina sem o recurso à convencional via parenteral, a mais utilizada atualmente por doentes insulino-dependentes. ⁽¹⁴³⁾

Um maior destaque recai, obviamente, nos trabalhos desenvolvidos na área das doenças infetocontagiosas, da autoria de vários grupos de investigação. Estes grupos têm vindo a desenvolver nanopartículas de quitosano contendo proteínas de superfície recombinantes de hepatite B encapsuladas e revestidas por alginato, com o intuito desenvolver imunidade local e sistémica através da vacinação oral com recurso a estas NPQ. Estes ensaios apresentaram também resultados promissores, demonstrando que houve uma indução de resposta imunitária mais robusta (tanto humoral como celular) com a formulação em que os Ag se encontravam encapsulados nas nanopartículas de quitosano. ^(144,145)

Apesar de todos estes sucessos relativos, ainda existem muitas questões e detalhes que são necessários esclarecer e documentar, bem como ensaios *in vivo* em modelos humanos para que esta tecnologia possa, nas próximas décadas, estar efetivamente ao serviço da saúde das populações.

5. VACINAÇÃO ORAL E CUSTOS ECONÓMICOS

Apesar de ser consensual no seio da comunidade científica que a vacinação oral apresenta largas vantagens económicas e logísticas (a par de todas as outras já referidas anteriormente), são escassos os dados palpáveis e concretos relativamente aos custos reais das campanhas de vacinação oral decorridas. Desta forma, esta secção fará apenas uma pequena introdução relativa aos métodos e indicadores mais utilizados na avaliação económica de vacinas, utilizando como exemplo o relatório elaborado pela Organização Mundial de Saúde relativamente à vacina oral contra a cólera em várias campanhas mundiais de controlo desta doença.

Atualmente, a saúde representa uma das maiores despesas nos orçamentos de famílias, sociedades e governos. Os vários intervenientes responsáveis pela aquisição de

tecnologias de saúde para a profilaxia, diagnóstico e tratamento das mais diversas patologias precisam, desta forma, de possuir ferramentas que os auxiliem na escolha das tecnologias mais apropriadas e efetivas, consoante as necessidades específicas de cada situação e o orçamento disponível para investir nesta área. A nível dos decisores políticos, esta responsabilidade ganha outra dimensão, visto que são decisões que irão afetar a população em geral, determinados grupos de utentes, prestadores de cuidados de saúde (empresas do ramo e profissionais de saúde), companhias de seguros de saúde, entre outros. Existem três métodos principais para avaliar os aspetos económicos de determinada tecnologia de saúde (neste caso, a vacinação oral): análise custo-benefício, análise custo-efetividade e análise custo-utilidade. A primeira ferramenta inclui todos os custos e benefícios que podem advir dos programas de imunização, num determinado período de tempo, e são geralmente expressos em dólares (\$). Quando o total de benefícios é superior ao total dos custos, o programa é avaliado como tendo valor presente líquido positivo, sendo que são (idealmente) escolhidas as tecnologias de saúde que apresentem um maior valor presente líquido. Já o segundo método referido anteriormente tem em conta os custos e as poupanças resultantes, por exemplo, de uma campanha de vacinação. Neste método, as unidades são expressas, por exemplo, em número de vidas salvas ou casos de doença evitados, em que os analistas calculam, em linhas gerais, o total de custos acarretados pela campanha e dividem-nos pelo número de vidas salvas ou casos de doença evitados, podendo desta forma estimar quantos dólares foram economizados ou gastos por cada caso prevenido. Esta ferramenta é de particular importância e utilidade nos casos em que existem duas ou mais abordagens para a mesma situação e que produzem resultados finais semelhantes na mesma população, sendo um exemplo flagrante de aplicação a análise de custo-efetividade entre as vacinas contra os vírus *influenza* e os antirretrovirais. Por fim, a última abordagem referida anteriormente (análise de custo-utilidade) analisa os custos envolvidos e os resultados produzidos por determinada tecnologia de saúde em função da sobrevivência e qualidade de vida desses sobreviventes. A utilidade deste método pretende dar uma maior abrangência aos outros métodos, que não conseguem avaliar devidamente todos os ganhos em saúde decorrentes da utilização de determinada tecnologia de saúde. Desta forma, este método permite estimar, por exemplo, o número de anos de vida que foram perdidos por falta de vacinação dos indivíduos que faleceram, bem como a qualidade de vida em termo de saúde dos que sobreviveram ao longo do tempo (i.e. se foi necessário efetuar alguma amputação, se foram causados danos neurológicos, entre outros). Ao contrário dos dois primeiros, este método não utiliza unidades monetárias, mas

sim anos de vida de qualidade ajustados (do inglês QALY) e anos de vida com incapacidade ajustados (do inglês DALY). Estes parâmetros têm em conta tanto a qualidade como a quantidade de vida remanescente gerados pela utilização da tecnologia de saúde em causa, em que um ano de perfeita saúde corresponde ao valor numérico de uma unidade (1). Se essa saúde não for considerada perfeita durante o ano, então o valor será inferior a 1, sendo a morte equivalente a 0. No entanto, alguns estados de saúde são considerados como piores que a morte, pelo que podem assumir valores inferiores a 0. Através deste método, é possível averiguar quantos dólares foram economizados ou gastos por QALY ganho. Este tipo de análise pode ajudar a perceber, por exemplo, quantos QALY são ganhos com exames complementares de diagnóstico na prevenção de diversos tipos de cancro. ⁽¹⁴⁶⁾

Um número significativo de análises de custo-efetividade têm sido realizadas em torno da vacinação contra a cólera ao longo dos últimos 10 anos, tanto endémica como em populações refugiadas, alguma tendo por bases situações hipotéticas e outras tendo por base dados reais. Estas análises utilizam ainda estimativas globais de incidências, custos e outras variáveis baseadas em dados empíricos específicos de determinados países onde ocorreram essas campanhas de vacinação, assumindo por isso diferentes vacinas contra a cólera a diferentes custos de aquisição. A maneira de expressar os dados e os métodos utilizados também diferem de estudo para estudo (só recentemente foi padronizada a utilização de DALY evitados). Desta breve descrição, fica bem patente a dificuldade em obter estudos que possam ser comparados e que tenham uma fiabilidade ajustada à realidade, razões essas que também explicam a falta de estudos nesta área. O *Anexo III* demonstra os resultados de 5 estudos de custo-efetividade realizados sobre a vacinal oral contra a cólera. Destes dados, destaca-se o facto de, em quase todas as situações, a vacina oral não apresentar uma avaliação custo-efetividade positiva, mas se tivermos em conta o efeito de comunidade (*i.e.* o bloqueio da transmissão da doença infetocontagiosa entre vários indivíduos pela vacinação apenas de alguns indivíduos), os resultados de custo-efetividade já se revelam largamente positivos, embora o dinheiro economizado em DALY evitados seja menor. O caso em que a poupança foi mais significativa foi na campanha decorrida na Indonésia, onde foram poupados cerca de 29.000\$ por DALY evitado. ⁽¹⁴⁷⁾

6. CONCLUSÃO

Os progressos dos últimos 30 anos nas áreas da biotecnologia, imunologia e tecnologia farmacêutica possibilitaram um enorme avanço na área da administração oral de péptidos, proteínas, ácidos nucleicos e outros materiais com o intuito de gerar imunidade a determinado agente patogénico. De entre as vias mucosas, a via oral continua a ser preferida para a administração de vacinas, embora pesem os inconvenientes relacionados com o ambiente acídico do trato gastrointestinal e as barreiras físicas e químicas do organismo humano. De modo a melhorar a qualidade de vida e a aceitação por parte da população-alvo, os investigadores têm vindo a desenvolver soluções que permitem a administração eficaz, rápida e de baixo custo de vacinas por via oral, através da encapsulação dos antígenos em nanopartículas poliméricas biodegradáveis e biocompatíveis, evitando assim o recurso às vacinas convencionais que utilizam a via parenteral e todos os inconvenientes decorrentes da utilização desta via. Acrescenta-se ainda o importante facto de, através da administração oral, se conseguir gerar tanto imunidade local como imunidade sistémica (relembre-se que a principal via de entrada de agentes patogénicos são as mucosas).

Atualmente, quase não existem problemáticas relativamente à encapsulação (e consequente proteção) de péptidos e proteínas, visto que os investigadores conseguem modular, praticamente, quase todas as propriedades físico-químicas do sistema que vai encapsular determinada molécula. O sucesso desta tecnologia estende-se ainda à possibilidade de direcionamento a determinadas estruturas/tecidos/tipos de células, através da modificação da superfície das nanopartículas. Este sistema de libertação de fármacos/antígenos reveste-se de diversas vantagens relativamente aos restantes sistemas coloidais, sendo os mais flagrantes a sua relativa estabilidade (embora dependente da composição do polímero e da via de administração), reduzida dimensão de partícula e elevada relação superfície/volume.

A escolha do polímero também tem uma substancial influência no sucesso da imunização por via oral. Neste campo, o quitosano tem vindo a marcar posição como polímero de eleição para aplicações imunológicas (*i.e.* vacinação por via oral), dadas as suas propriedades biodegradáveis, biocompatíveis, bioaderentes e imunoestimulatórias, aliadas aos baixos custos de aquisição e transformação. Este polímero possibilita ainda um aumento da permeabilidade das uniões íntimas a nível do intestino e uma melhor captação e absorção das nanopartículas/antígenos por parte das células do epitélio intestinal

Os resultados de vários artigos que envolvem a utilização de nanopartículas para administração oral de vacinas têm apresentado resultados bastante motivadores e concretos

no que concerne às potencialidades desta tecnologia. No entanto, é também necessário ter em conta que os resultados são baseados em modelos experimentais *in vitro* ou em modelos animais e que por vezes existem grandes variações nas condições em que se realizam os diferentes ensaios (*e.g.* diferentes métodos de preparação, materiais de diversas origens, polímeros e fármacos/antígenos com diferentes propriedades), pelo que a extrapolação destes resultados para modelos humanos *in vivo* tem de ser feita com muita cautela, ao mesmo tempo que urge a necessidade de realizar mais ensaios com voluntários humanos para aferir a verdadeira eficácia desta tecnologia (note-se que os resultados preliminares destes ensaios foram também positivos e bastante promissores), e ao mesmo tempo tentar padronizar os protocolos experimentais.

O futuro desta tecnologia permanece ainda incerto, bem como o seu impacto toxicológico a médio-longo prazo no organismo humano e nos ecossistemas. No entanto, prevê-se que a utilização das nanopartículas seja rapidamente generalizada e estendida a outras áreas terapêuticas, como seja na área do cancro e em algumas doenças infecciosas crónicas (*e.g.* SIDA).

Por fim, é ainda de realçar a falta de estudos e análises mais escrupulosas relativamente aos custos operacionais decorrentes da utilização de vacinas orais em campanhas de vacinação, de modo a conseguir alargar a cobertura de vacinação a populações mais desfavorecidas economicamente, como é o caso dos países subdesenvolvidos e em vias de desenvolvimento que, regra geral, apresentam baixos índices de riqueza e uma elevada taxa de mortalidade em todas as idades para doenças infecto-contagiosas suscetíveis de prevenção por vacinação.

7. BIBLIOGRAFIA

1. *Global Immunization Data*. s.a. s.l. : UNICEF/World Health Organization, 2012.
2. **BLOOM, B.R. e WIDDUS, R.** Vaccine visions and their global impact. *Nat. Med.* 1998, Vol. 4, pp. 480–484.
3. **AZIZ, Mohd Azha, MIDHA, Shuchi e WAHEED, Syed Mohsin .** Oral vaccines: new needs,new possibilities. [ed.] Wiley Periodicals. *BioEssays*. 2007, 29, pp. 591–604.
4. **HOLMGREN, J. e CZERKINSKY, C.** Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med.* 2005, Vol. 11, 4, pp. 45-53.
5. **BACHMANN, Martin F. e JENNINGS, Gary T.** Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature Reviews Immunology*. 2010, Vol. 10, pp. 787–796.
6. **WEINER, H.L., FRIEDMAN , A. e MILLER, A.** Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol*. 1994, 12, pp. 809-837.
7. **MOHANRAJ, V.J. e CHEN, Y.** Nanoparticles – A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2006, Vol. 5, 1, pp. 561-573.
8. **SAROJA, C.H., LAKSHMI, P.K. e BHASKARAN, Shyamala .** Recent trends in vaccine delivery systems: A review. *Int J Pharma Investig*. 2011, Vol. 1, pp. 64-74.
9. **DES RIEUX, Anne , FIEVEZ, Virginie e GARINOT, Mari.** Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *Journal of Controlled Release*. 2006, Vol. 116, pp. 1–27.
10. **CHOPRA, S., MAHDI, S. e KAUR, J.** Advances and potential applications of chitosan derivatives as mucoadhesive biomaterials in modern drug delivery. *J. Pharm Pharmacol*. 2006, Vol. 58, 8, pp. 1021-1032.
11. **BORGES, O., BORCHARD, Gerrit e VERHOEF, J. Coos .** Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005, Vol. 299, pp. 155–166.
12. **THUCYDIDES.** *The English Works of Thomas Hobbes (Thucydides Peloponnesian War Part I)*. [trad.] Thomas Hobbes. Indiana : Liberty Fund Inc., 1839. p. 12 a 23. Vol. 8.
13. **GOLDSBY, Richard A., KINDT, Thomas J. e OSBORNE, Barbara A.** *Kuby Immunology*. 5ª. Londres : W. H. Freeman, 2006. p. 1 a 3.

14. **FELICIANO, João.** A Vacinação e a sua História. *Cadernos da Direcção-Geral da Saúde*. n.º 2, 2020, p. 3 a 7.
15. **WALLINGTON, Tim.** Vaccination. *Dr. Jenner's House*. [Online] 2012. [Citação: 31 de Março de 2012.] <http://www.jennermuseum.com/Jenner/vaccination.html>.
16. **DE SOUZA, Luís Octávio Gomes.** Estudos superiores e de especialização - Louis Pasteur. *Biblioteca Virtual em Saúde*. [Online] 2012. [Citação: 04 de Abril de 2012.] http://www.bvsalut.coc.fiocruz.br/html/pt/static/trajetoria/origens/estudos_louis.htm.
17. **KOTAIT, Ivanete, CARRIERI, Maria Luiza e TAKAOKA, Neide Yumie.** Raiva - aspetos gerais e clínica. *Manual Técnico do Instituto Pasteur*. n.º8, 2009, pp. 1-12.
18. **TALMAGE, David W.** The acceptance and rejection of immunological concepts. *Annual Reviews Immunology*. 1986, pp. 1-12.
19. **LANDSTEINER, Karl e LEVINE, Philip.** On Individual Differences in Human Blood. [autor do livro] Jan LINDSTEN. *Nobel Lectures - Physiology or Medicine 1922-1941*. Amesterdão : Elsevier Publishing Company, 1965, pp. 757-775.
20. **HILLEMANN, Maurice R.** Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries. *Vaccine*. 2000, Vol. 18, pp. 1436-1447.
21. **KÖHLER, George.** Derivation and diversification of monoclonal antibodies. [autor do livro] Jan LINDSTEN. *Nobel Lectures - Physiology or Medicine 1981-1990*. Singapura : World Scientific Publishing Co, 1993, pp. 228-243.
22. **s.a.** Polio and prevention. *polio global eradication initiative*. [Online] 2012. [Citação: 21 de 09 de 2012.] <http://www.polioeradication.org/Polioandprevention.aspx>.
23. **CLAMAN, Henry N., CHAPERON, Edward A. e TRIPLETT, R. Faser.** Thymus-marrow cell combinations. Synergism in antibody production. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1966, pp. 1167-1171.
24. **PORTER, Rodney R.** Structural studies of immunoglobulins. [autor do livro] Jan LINDSTEN. *Nobel Lectures - Physiology or Medicine 1971-1980*. Singapura : World Scientific Publishing Co., 1992.
25. **EDELMAN, Gerald M.** Antibody structure and molecular immunology. [autor do livro] Jan LINDSTEN. *Nobel Lectures - Physiology or Medicine 1971-1980*. Singapura : World Scientific Publishing Co., 1992.
26. **HILSCHMANN, Norbert e CRAIG, Lyman.** Amino acid sequence studies with Bence-Jones proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6, Junho de 1965, Vol. 53, pp. 1403-1409.

27. **EDELMAN, Gerald M., CUNNINGHAM, Bruce A. e GALL, W. Einar.** The covalent structure of an entire γ immunoglobuline molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1, Maio de 1969, Vol. 63, pp. 78-85.
28. **KUNG, Patrick, REINHERZ, Ellis e GOLDSTEIN, Gideon.** Further characterization of the human inducer T cell subset defined by monoclonal antibody. *The Journal of Immunology.* 6, Dezembro de 1979, Vol. 123, pp. 2894-2996.
29. **MCDEVITT, Hugh O., DEAK, Beverly D. e SHREFFLER, Donald C.** Genetic control of the antibody response in inbred mice: transfer of response by spleen cells and linkage to the Major Histocompatibility (H-2) Locus. *The Journal of Experimental Medicine.* 1, Julho de 1968, Vol. 128, pp. 1-11.
30. **TONEGAWA, Susumu.** Somatic Generation of Immune Diversity. [autor do livro] Jan LINDSTEN. *Nobel Lectures - Physiology or Medicine 1981-1990.* Singapura : World Scientific Publishing Co., 1993, pp. 381-405.
31. **GORDON, Jon, SCANGOS, George e BARBOSA, James A.** Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 12, Dezembro de 1980, Vol. 77, pp. 7380-7384.
32. **ALLISON, James.** Tumor-specific antigen of murine T-lymphoma defined with monoclonal antibody. *Journal of Immunology.* 5, Novembro de 1982, Vol. 129, pp. 2293-2300.
33. **DAVIS, Mark M., HEDRICK, Stephen M. e COHEN, David I.** Isolation of cDNA Clones Encoding T Cell-Specific Membrane-Associated Proteins. *Nature.* 1984, Vol. 308, pp. 149-153.
34. **ABBAS, Abul K. , LICHTMAN, Andrew H. e PILLAI, Shiv.** *Cellular and Molecular Immunology.* [ed.] W B Saunders Co. 6ª. Philadelphia : Softcover, 2007.
35. **ABBAS, Abul K. e JANEWAY JR., Charles A .** Immunology: Improving on Nature in the Twenty-First Century. *Cell.* 2000, Vol. 100, 1, pp. 129–138.
36. **JANEWAY JR., C.A.** Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989, Vol. 54, pp. 1-13.
37. **MOINGEON, Philippe, DE TAISNE, Charles e ALMOND, Jeffrey .** Delivery technologies for human vaccines. *Br Med Bull.* 2002, Vol. 62, 1, pp. 29-44.
38. **VARMUS, Harold .** The Immune System. *Nacional Cancer Institute.* [Online] 2012. [Citação: 19 de 08 de 2012.] <http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/immunesystem/AllPages>.

39. **SHAKWEH, M., PONCHEL, G. e FATTAL, E.** Particle uptake by Peyer's patches: a pathway for drug and vaccine delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2004, Vol. 1, 1, pp. 141-63.
40. **QUIDING, Marianne , NORDSTROM, Inger e KILAND, Anders.** Oral Cholera Vaccination Induces Strong Intestinal Antibody Responses and Interferon- γ Production and Evokes Local Immunological Memory. *J. Clin. Invest.* 1991, Vol. 88, pp. 143-148.
41. **HART, Karen.** Histology Photomicrographs. *Eugraph.* [Online] 2010. [Citação: 19 de 08 de 2012.] <http://eugraph.com/histology/lymph/peyer.html>.
42. **CRUVINEL, Wilson de Melo , JÚNIOR, Danilo Mesquita e ARAÚJO, Júlio Antônio Pereira .** Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol.* 2010, Vol. 50, 4, pp. 434-461.
43. **MEDZHITOV, R. e JANEWAY, C. Jr.** Innate immunity. *N Engl J Med.* 2000, Vol. 343, pp. 338-44.
44. **NAKANISHI, K.** Basophils as APC in Th2 response in allergic inflammation and parasite infection. *Curr Opin Immunol.* 2010, Vol. 22, 6, pp. 814-20.
45. **JÚNIOR, Danilo Mesquita , ARAÚJO, Júlio Antônio Pereira e CATELAN, Tânia Tiekō Takao.** Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Reumatol.* 2010, Vol. 50, 5, pp. 552-580.
46. **CATELAN, Tânia Tiekō Takao e JUNIOR, Danilo Mesquita.** Linfócitos B: da imunobiologia aos imunobiológicos. *Sinopse de Reumatologia.* 2008, Vol. 10, pp. 35-57.
47. **NIKOLICH-ZUGICH, I., SLIFKA, M.K. e MESSAOUDI, I.** The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat Rev Immunol.* 2004, Vol. 4, 2, pp. 123-132.
48. **STUTMAN, O.** Intrathymic and extrathymic T cell maturation. *Immunol Rev.* 1978, Vol. 42, pp. 138-184.
49. **JIANG, H. e CHESS, L.** An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest.* 2004, Vol. 114, 9, pp. 1198-1208.
50. **s.a.** Regiões Determinantes De Complementaridade. *LookForDiagnosis.* [Online] 2012. [Citação: 19 de 08 de 2012.] http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Regi%C3%B5es+Determinantes+De+Complementaridade&lang=3.
51. —. Vaccines & Immunizations. *Centers for Disease Control and Prevention.* [Online] 2012. [Citação: 18 de 09 de 2012.] <http://www.cdc.gov/vaccines/>.

52. —. Types of vaccines. *The Immunisation Advisory Centre*. [Online] School of Population Health: The University of Auckland, 2012. [Citação: 21 de 09 de 2012.] <http://www.immune.org.nz/types-vaccines>.
53. **NOCHI, Tomonori, TAKAGI, Hidenori e YUKI, Yoshikazu.** Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. *PNAS*. 2007, Vol. 124, 26, pp. 10986–10991.
54. **LEVINE, Myron M. .** “IDEAL” vaccines for resource poor settings. *Vaccine*. 2011, 29, pp. 116-125.
55. **AZIZI, A., KUMAR, A. e DIAZ-MITOMA, F.** Enhancing Oral Vaccine Potency by Targeting Intestinal M Cells. *PLoS Pathog*. Novembro de 2010, Vol. 6, 11.
56. **CHADWICK, Sandra, KRIEGEL, Christina e AMIJI, Mansoor .** Delivery strategies to enhance mucosal vaccination. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2009, Vol. 9, 4, pp. 427-440.
57. **CESTA, Mark F.** Normal Structure, Function, and Histology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. *Toxicologic Pathology*. 2006, Vol. 34, pp. 599–608.
58. **NEUTRA, M.R. e KOZLOWSKI, P.A.** Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol*. 2006, 6, pp. 58-148.
59. **BRANDTZAEG, Per.** Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine*. 2007, 25, pp. 5467–5484.
60. **HERREMANS, TMPT e REIMERINK, JHJ.** Induction of mucosal immunity by inactivated poliovirus vaccine is dependent on previous mucosal contact with live virus. *J Immunol*. 1999, 168, pp. 5011–8.
61. **WEBSTER, D.E., GAHAN, M.E. e STRUGNELL, R.A.** Advances in oral vaccine delivery options: what is on the horizon? *American Journal of Drug Delivery*. 2003, Vol. 1, 4, pp. 227-240.
62. **MAYER, L. e SHAO, L.** Therapeutic potential of oral tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2004, Vol. 4, 6, pp. 407-419.
63. **PATEL, Manish, ANDI, L. Shane e PARASHAR, Umesh.** Oral Rotavirus Vaccines: How Well Will They Work Where They Are Needed Most? *The Journal of Infectious Diseases*. 2009, Vol. 200, pp. 39–48.
64. **WHITMAN, WB, COLEMAN, DC e WIEBE, WJ.** Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998, Vol. 95, pp. 6578–6583.

65. **BRANDTZAE, P., BAEKKEVOLDS , E.S. e FARSTAD, I.N.** Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunol Today*. 1999, Vol. 20, pp. 141–151.
66. **MOWAT, Allan McI. .** Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology*. 2003, Vol. 3, pp. 331-341.
67. **CLARK, M.A. e HIRST, B.H.** Expression of junction-associated proteins differentiates mouse intestinal M cells from enterocytes. *Histochem Cell Biol*. 2002, Vol. 118, 137–147.
68. **OWEN, R.L.** Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer’s patches--a personal and historical perspective. *Semin Immunol*. 1999, 11, pp. 157–163.
69. **NAGLER-ANDERSON, C.** Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nat Rev Immunol*. 2001, Vol. 1, pp. 59-67.
70. **NEUTRA, M.R., FREY, A. e KRAEHENBUHL, J.P.** Epithelial M cells: Gateways for mucosal infection and immunization. *Cell*. 1996, 86, p. 345.
71. **MACPHERSON, G.G. e LIU, L.M.** Dendritic cells and Langerhans cells in the uptake of mucosal antigens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 1999, 236, pp. 33–53.
72. **FRIEDMAN, A. e WEINER, H.L.** Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1994, Vol. 91, pp. 6688-6692.
73. **CHEN, Y., KUCHROO, V.K. e INOBE, J.I.** Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: Suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*. 1994, Vol. 265, pp. 1237-1240.
74. **WHITACRE , C.C., GIENAPP, I.E. e OROSZ, C.G.** Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis III. Evidence for clonal anergy. *J. Immunol*. 1991, Vol. 147, pp. 2155-2163.
75. **CRITCHFIELD, J.M., RACKE, M.K. e ZUNIGA-PFLUCKER, J.** T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis. *Science*. 1994, Vol. 263, pp. 1139-1143.
76. **JAIN, Kewal K.** *Drug Delivery Systems - Methods in Molecular Biology*. Basel : Humana Press, 2008.
77. **GALINDO-RODRIGUEZ, S.A. , ALLEMANN, E. e FESSI, H.** Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of in vivo studies. *of in vivo studies*. 2005, Vol. 22, pp. 419–464.

78. **LOWE, P.J. e TEMPLE, C.S.** Calcitonin and insulin in isobutylcyanoacrylate nanocapsules: protection against proteases and effect on intestinal absorption in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 1994, Vol. 46, pp. 547–552.
79. **KUMARI, Avnesh, YADAV, Sudesh Kumar e YADAV, Subhash C. .** Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2010, Vol. 75, 1, pp. 1–18.
80. **CHADWICK, Sandra, KRIEGEL, Christina e AMIJI, Mansoor.** Nanotechnology solutions for mucosal immunization. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2010, Vol. 62, pp. 394–407.
81. **ZOLNIK, Banu S. , GONZALÉZ-FERNANDÉZ, África e SADRIEH, Nakissa .** Minireview: Nanoparticles and the Immune System. *Endocrinology.* 2010, Vol. 151, 2, pp. 458-465.
82. **THASSU, Deepak, DELEERS, Michel e PATAK, Yashwant.** *Drugs ans the Pharmaceuticals Sciences - Nanoparticulate Drug Delivery Systems.* Londres : Informa healthcare, 2007.
83. **SCHAFFAZICK, Scheila Rezende e STANISÇUASKI, Sílvia.** Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova.* 2003, Vol. 26, 5, pp. 726-737.
84. **BRAZ, Luís, DIONÍSIO, Marita e GREHA, Ana.** Chitosan-based nanocarriers: effective vehicles for mucosal protein delivery. *Chitosan: Manufacture, Properties, and Usage.* s.l. : Nova Science Publishers, 2008.
85. **RÉFEGA, Ricardo João Martins.** *Nanopartículas para Aplicação Biomédica.* Lisboa : Instituto Superior Técnico - Universidade Técnica de Lisboa, 2010.
86. **LACOUILONCHE, F., GAMISANS, F. e CHAUVET, A.** Stability and in vitro drug release of flurbiprofen-loaded poly-epsilon-caprolactone nanospheres. *Drug Dev Ind Pharm.* 1999, Vol. 25, 9, pp. 983-993.
87. **DE ASSIS, Letícia Marques , ZAVAREZE, Elessandra da Rosa e PRENTICE-HERNÁNDEZ, Carlos .** Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. *Brazilian Journal of food technology.* 2012, Vol. 15, 2, pp. 99-109.
88. **DE JONG, Wim H. e BORM, Paul J.A.** Drug delivery and nanoparticles: application and hazards. *International Journal of Nanomedicine.* 2008, Vol. 3, 2, pp. 133-149.
89. **SOZER, N. e KOKINI, J.L.** Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in Biotechnology.* 2009, Vol. 27, 2, pp. 82-89.

90. **WAECKERLE-MEN, Y. e GROETTRUP, M.** PLGA microspheres for improved antigen delivery to dendritic cells as cellular vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005, Vol. 57, 3, pp. 475-482.
91. **BAHVSAR, M.D. e AMIJI, M.M.** Polymeric nano- and microparticle technologies for oral gene delivery. *Exp. Opin. Drug Deliv.* 2007, Vol. 4, pp. 197–213.
92. **GELPERINA, S., KISICH, K. e ISEMAN, M.D.** The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005, Vol. 172, pp. 1487–1490.
93. **MAHAPATRO, Anil e SINGH, Dinesh K.** Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *Journal of Nanobiotechnology.* 2011, Vol. 9, 55, pp. 1-11.
94. **FONSECA, C., SIMÕES, S. e GASPAR, R.** Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J. Control. Release.* 2002, Vol. 83, pp. 273–286.
95. **GOVENDER, T., STOLNIK, S. e GARNETT, M.C.** PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J. Control. Release.* 1999, Vol. 57, pp. 171–185.
96. **JEFFERY, H. , DAVIS, S.S. e O'HAGAN, D.T.** The preparation and characterisation of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. I: Oil-in-water emulsion. *Int. J. Pharm.* 1991, Vol. 77, pp. 169–175.
97. **ZAMBAUX, M.F. , BONNEAUX, F. e GREF, R.** Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *J. Control. Release.* 1998, Vol. 50, pp. 31–40.
98. **TAKEUCHI, H. , THONGBORISUTE, J. e MATSUI, Y.** Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. *Adv Drug Deliv. Rev.* 2005, Vol. 57, pp. 1583–1594.
99. **CLARK, M.A. , HIRST, B.H. e JEPSON, M.A.** Lectin-mediated mucosal delivery of drugs and microparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2000, Vol. 43, pp. 207–223.
100. **RUSSEL-JONES, G.J. , VEITCH, H. e ARTHUR, L.** Lectin-mediated transport of nanoparticles across Caco-2 and OK cells. *Int. J. Pharm.* 1999, Vol. 190, pp. 165–174.
101. **HUSSAIN, N., JAITLEY, V. e FLORENCE, A.T.** Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001, Vol. 50, pp. 107–142.

102. **FLORENCE, A.T.** Nanoparticle uptake by the oral route: fulfilling its potential? *Drug Discov. Today. Technol.* 2005, Vol. 2, pp. 75–81.
103. **NELLANS, H.N.** . Mechanisms of peptide and protein absorption: paracellular intestinal transport: modulation of absorption. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1991, Vol. 7, pp. 339–364.
104. **SALAMAT-MILLER, N. e JOHNSTON, T.P.** Current strategies used to enhance the paracellular transport of therapeutic polypeptides across the intestinal epithelium. *Int. J. Pharm.* 2005, Vol. 294, pp. 201–216.
105. **HOFMAN, P.** . Pathological interactions of bacteria and toxins with the gastrointestinal epithelial tight junctions and/or the zonula adherens: an update. *Cell. Mol. Biol.* 2003, Vol. 49, pp. 65–75.
106. **AKAGI, Takami , BABA, Masanori e AKASHI, Mitsuru.** Biodegradable Nanoparticles as Vaccine Adjuvants and Delivery Systems: Regulation of Immune Responses by Nanoparticle-Based Vaccine. *Adv Polym Sci.* 2012, Vol. 247, pp. 31–64.
107. **BANCHEREAU, J. e STEINMAN, R.M.** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998, Vol. 392, pp. 245–252.
108. **O'HAGAN, D.T.** Intestinal translocation of particulates—implications for drug and antigen delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1990, Vol. 5, pp. 265–285.
109. **FLORENCE, A.T.** Issues in oral nanoparticle drug carrier uptake and targeting. *J. Drug Target.* 2004, Vol. 12, pp. 65–70.
110. **HUSSAIN, N.** Ligand-mediated tissue specific drug delivery. *Adv. Drug.* 2000, Vol. 43, pp. 95–100.
111. **WEISSENBOCK, A. , WIRTH, M. e GABOR, F.** WGA-grafted PLGA-nanospheres:preparation and association with Caco-2 single cells. *J. Control. Release.* 2004, Vol. 99, pp. 383–392.
112. **CRUZ, N., ALVAREZ, X. e SPECIAN, R.D.** Role of mucin, mannose, and beta-1 integrin receptors in Escherichia coli translocation across Caco-2 cell monolayers. *Shock.* 1994, Vol. 2, pp. 121–126.
113. **SHARMA, R., VAN DAMME, E.J. e PEUMANS, W.J.** Lectin binding reveals divergent carbohydrate expression in human and mouse Peyer's patches. *Histochem. Cell Biol.* 1996, Vol. 105, pp. 459–465.
114. **JEPSON, M.A. , CLARK, M.A. e FOSTER, N.** Targeting to intestinal M cells. *J. Anat.* 1996, Vol. 189, 3, pp. 507–516.

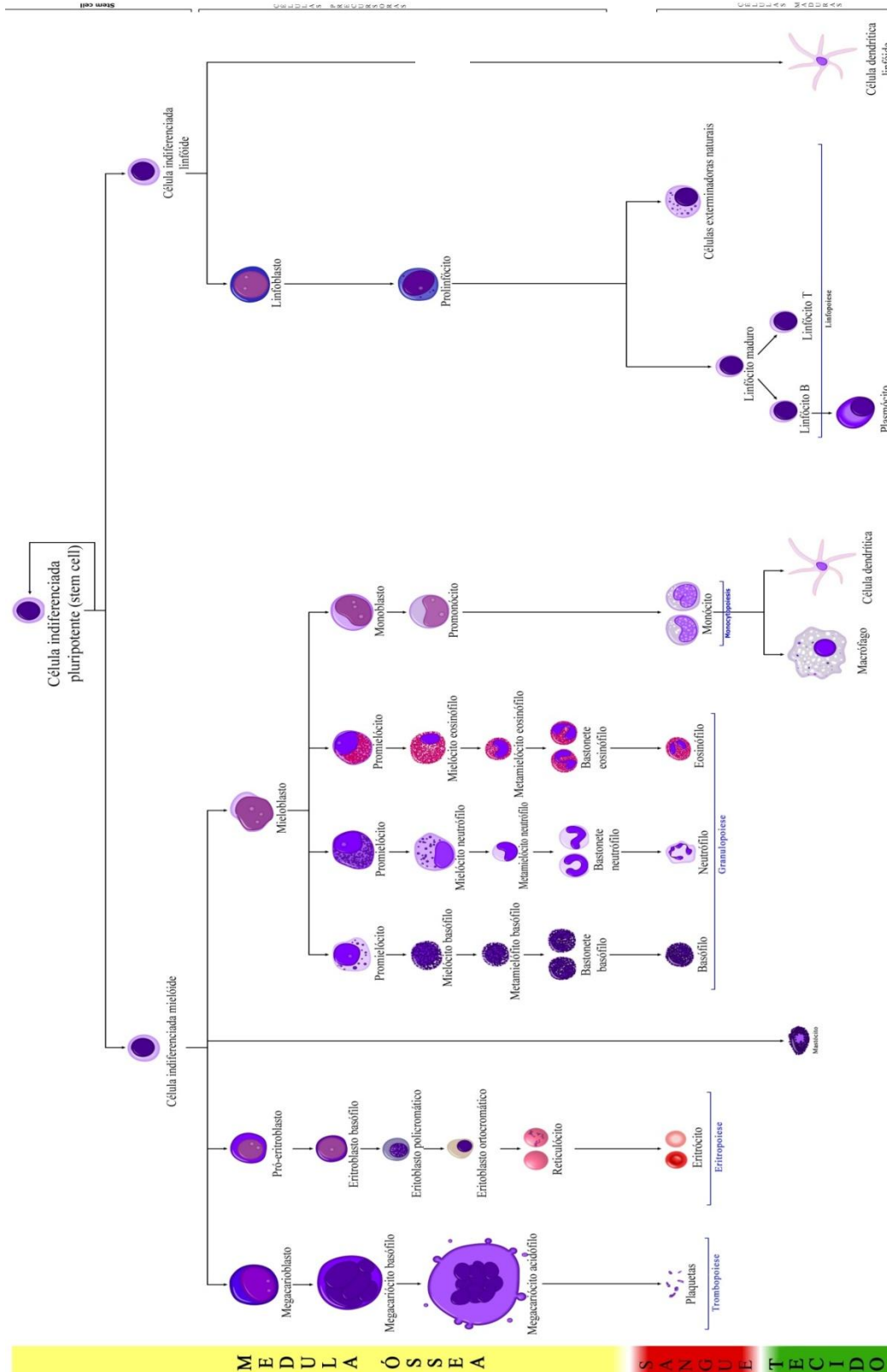
115. **SALMAN, H.H., GAMAZO, C. e CAMPANERO, M.A.** Salmonella-like bioadhesive nanoparticles. *J. Control. Release.* 2005, Vol. 106, pp. 1–13.
116. **ROY, M.J. e VARVAYANIS, M.** Development of dome epithelium in gut-associated lymphoid tissues: association of IgA with M cells. *Cell Tissue Res.* 1987, Vol. 248.
117. **BRAYDEN, D.J. e BAIRD, A.W.** Microparticle vaccine approaches to stimulate mucosal immunisation. *Microbes Infect.* 2001, Vol. 3, pp. 867–876.
118. **BRAYDEN, D.J. e BAIRD, A.W.** Apical membrane receptors on intestinal M cells: potential targets for vaccine delivery,. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004, Vol. 56, pp. 721–726.
119. **WU, T. e ZIVANOVIC, S.** Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method. *Carbohydrate Polymers.* 2008, Vol. 73, pp. 248–253.
120. **KUMAR, Majeti N.V Ravi .** A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers.* 2000, Vol. 46, 1, pp. 1–27.
121. **SILVA, Hélio S. R. Costa , DOS SANTOS, Kátia S. C. R. e FERREIRA, Elizabeth I. .** Chitosan: hydrossoluble derivatives, pharmaceutical applications and recent advances. *Química Nova.* 2006, Vol. 29, 4.
122. **CRINI, G.** Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbent in wastewater treatment. *Progress in Polym. Sci.* 2005, Vol. 30, 38.
123. **OKUYAMA, K., NOGUCHI, K. e KANENARI, M.** Structural diversity of chitosan and its complexes. *Carbohydrate Polymers.* 2000, Vol. 41, 237.
124. **JÚNIOR, Ezequiel de Souza Costa .** *Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulada para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial.* Belo Horizonte : Escola de Engenharia da UFMG , 2008.
125. **CRINI, G. e BADOT, P.M.** Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. *Progress in Polym. Sci.* 2008, Vol. 33, 399.
126. **ANTONINO, N.A.** *Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana.* s.l. : Programa de Pós-graduação em Química - UFPB, 2007.
127. **LIMA, I.S., LAZARIN, A.M. e AIROLDI, C.** Cyclic voltammetric investigations on copper a-N,O-succinated chitosan interactions. *Carbohydr. Polym.* 2006, Vol. 64, 385.
128. **PAÑOS, Inés , ACOSTA, Niuris e HERAS, Angeles.** New Drug Delivery Systems Based on Chitosan. *Current Drug Discovery Technologies.* 2008, Vol. 5, pp. 333-341.

129. **DAMIAN, César, BEIRÃO, Luiz Henrique e DE FRANCISCO, Alicia .** Quitosana: um aminopolissacarídeo com características funcionais. *Alim. Nutr.* 2005, Vol. 16, 2, pp. 195-205.
130. **NAGPAL, Kalpana , SINGH, Shailendra Kumar e MISHRA, Dina Nath .** Chitosan Nanoparticles: A Promising System in Novel Drug Delivery. *Chem. Pharm. Bull.* 2010, Vol. 58, 11, pp. 1423—1430.
131. **GASEROD, O., JOLLIFFE, I.G. e HAMPSON, F.C.** The enhancement of the bioadhesive properties of calcium alginate gel beads by coating with chitosan. *International Journal of Pharmaceutics.* 1998, Vol. 175, 237.
132. **BODMEIER, R., CHEN, H.G. e PAERATAKUL, O.** A novel approach to the oral delivery of micro- or nanoparticles. *Pharm Res.* 1989, Vol. 6, 5, pp. 413-417.
133. **MISHRA, Neeraj, GOYAL, Amit K. e KHATRI, Kapil.** Biodegradable Polymer Based Particulate Carrier(s) for the Delivery of Proteins and Peptides. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry.* 2008, Vol. 7, pp. 240-251 .
134. **VAN DER LUBBEN, I.M., VERHOEF, J.C. e BORCHARD, G.** Chitosan for mucosal vaccination. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2011, Vol. 52, 2, pp. 139–144.
135. **SONIA, T.A. e SHARMA, Chandra P.** Chitosan and Its Derivatives for Drug Delivery Perspective. *Adv Polym Sci.* 2011, Vol. 243, pp. 23–54.
136. **VAN DER LUBBEN, I.M., VERHOEF, J.C. e VAN AELST, A.** Chitosan microparticles for oral vaccination preparation, characterization and preliminary in vivo uptake in murine Peyer’s patches. *Biomaterials.* Vol. 22, pp. 687–694.
137. **VAN DER LUBBEN, Inez M., VERHOEF, J. Coos e BORCHARD, Gerrit .** Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2001, Vol. 14, pp. 201–207.
138. **BANSAL, Vipin , SHARMA, Pramod Kumar e SHARMA, Nitin.** Applications of Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery. *Advances in Biological Research.* 2011, Vol. 5, 1, pp. 28-37.
139. **VAN DER LUBBEN, I.M., KONINGS, F.A. e BORCHARD, G.** In vivo uptake of chitosan microparticles by murine Peyer’s patches: visualization studies using confocal laser scanning microscopy and immunohistochemistry. *J. Drug Target.* 2001, Vol. 9, pp. 39–47.
140. **BIVAS-BENITA, M., LALOUP, M. e VERSTEYHE, S.** Generation of *Toxoplasma gondii* GRA1 protein and DNA vaccine loaded chitosan particles: preparation, characterization, and preliminary in vivo studies. *Int. J. Pharm.* 2003, Vol. 266, pp. 17–27.

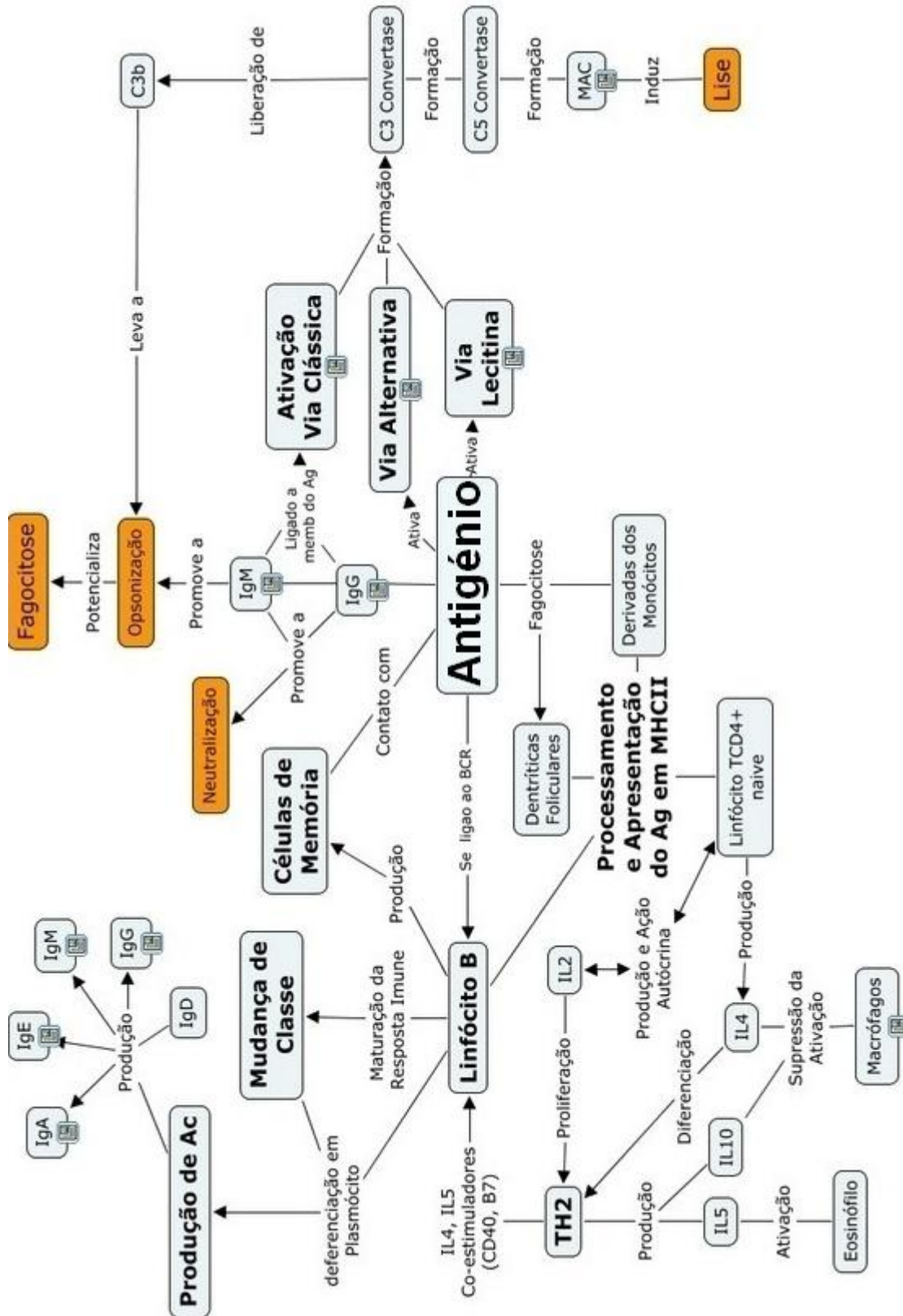
141. **BORGES, Olga, CORDEIRO-DA-SILVA, Anabela e ROMEIJN, Stefan G. .** Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination. *Journal of Controlled Release*. 2006, Vol. 114, pp. 348–358.
142. **EL-SHABOURI, M.H.** Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A. *Int. J. Pharm.* 2002, Vol. 249, pp. 101-108.
143. **CHEN, J., YANG, W.L. e LI, G.** Transfection of mEpo gene to intestinal epithelium in vivo mediated by oral delivery of chitosan-DNA nanoparticles. *World J. Gastroenterol.* 2004, Vol. 10, pp. 112-116.
144. **PAN, Y., LI, Y. e ZHAO, H.** Chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int. J. Pharm.* 2002, Vol. 249 .
145. **PREGOA, Cecilia , PAOLICELLI, Patrizia e DÍAZB, Belen.** Chitosan-based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection. *Vaccine*. 2010, Vol. 28, pp. 2607–2614.
146. **TAVARES, Joana, BORGES, Olga e DE SOUSA, Adriano.** Evaluation of the immune response following a short oral vaccination schedule with hepatitis B antigen encapsulated into alginate-coated chitosan nanoparticles. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2007, Vol. 32, pp. 278–290.
147. **s.a.** Vaccine Economics - Immunization Issue. *National Network for Immunization Information*. [Online] 2 de Novembro de 2006. [Citação: 28 de 09 de 2012.] <http://www.immunizationinfo.org/issues/immunization-policy/vaccine-economics>.
148. **ABRAMSON, J.S.** *Background Paper on the Integration of Oral Cholera Vaccines into Global Cholera Control Programmes* . s.l. : UNICEF/World Health Organization, 2009.
149. **s.a.** Visual hematopoiesis. *Dentalarticles*. [Online] Dentalarticles, 2012. [Citação: 01 de 10 de 2012.] <http://www.dentalarticles.com/visual/d/hematopoiesis.php>.

8. ANEXOS

Anexo I – Esquema da hematopoiese humana e diferenciação das células do sistema imunitário [adaptado de (148)].



Anexo II – Fluxograma-resumo da atuação do sistema imunitário adaptativo face à presença de um antígeno.



Anexo III – Quadro resumo das várias campanhas de vacinação oral contra a cólera
[adaptado de (146)].

Parameters	Without herd effects				With herd effect			
	Matlab, Bangladesh	Kolkata, India	N. Jakarta, Indonesia	Beira, Mozambique	Matlab, Bangladesh	Kolkata, India	N. Jakarta, Indonesia	Beira, Mozambique
Overall incidence rates (per 1,000) (surveillance period)	1.5 (avg. 1994-2003)	1.6 (2003-2005)	0.45 (2001-2003)	4.0 (2003-2004)	1.5 (avg. 1994-2003)	1.6 (2003-2005)	0.45 (2001-2003)	4.0 (2003-2004)
Programs targeting school children (5-14 years old)								
Number vaccinations	21,296	16,036	14,421	65,938	21,296	16,036	14,421	65,938
Cases avoided over three years	56	60	7	322	341	301	65	2615
% reduction in cases over three years	5%	6%	3%	5%	33%	31%	30%	38%
Deaths avoided over three years	1	1	0	3	3	3	1	26
Net public cost per DALY avoided	\$4,031	\$2,858	\$28,851	\$2,371	\$643	\$542	\$3,242	\$213
GDP/capita	\$486	\$871	\$1,812	\$382	\$486	\$871	\$1,812	\$382
3 times GDP/capita	1,458	\$2,613	\$5,436	\$1,146	1,458	\$2,613	\$5,436	\$1,146
Cost-effectiveness rating	Not cost-effective	Not cost-effective	Not cost-effective	Not cost-effective	Cost-effective	Very cost-effective	Cost-effective	Very cost-effective
Programs targeting children 1-14 years old								
Number vaccinations	34,475	23,702	19,712	89,282	34,475	23,702	19,712	89,282
Cases avoided over three years	141	151	21	672	517	448	91	3393
% reduction in cases over three years	14%	16%	10%	10%	50%	47%	42%	49%
Deaths avoided over three years	1	2	0	7	5	4	1	34
Net public cost per DALY avoided	\$2,544	\$1,621	\$13,111	\$1,479	\$689	\$534	\$3,152	\$227
Cost-effectiveness rating	Not cost-effective	Cost-effective	Not cost-effective	Not cost-effective	Cost-effective	Very cost-effective	Cost-effective	Very cost-effective
Programs for children and adults (1 year and older)								
Number vaccinations	72,653	82,796	38,473	257,595	72,653	82,796	38,473	257,595
Cases avoided over three years	207	244	30	1772	749	779	135	5692
% reduction in cases over three years	20%	25%	14%	26%	73%	81%	62%	82%
Deaths avoided over three years	2	2	0	18	7	8	1	57
Net public cost per DALY avoided	\$3,896	\$3,812	\$19,199	\$1,851	\$1,046	\$1,151	\$4,208	\$484
Cost effectiveness rating	Not cost-effective	Not cost-effective	Not cost-effective	Not cost-effective	Cost-effective	Cost-effective	Cost-effective	Cost-effective