

Imunoprofilaxia anti-herpética utilizando vírus geneticamente modificado: vacina DISC*

*Antitherpetic immunoprophylaxy with genetically modified virus: DISC vaccine**

Omar Lupi¹

Resumo: As vacinas anti-herpéticas podem atuar de forma profilática ou terapêutica contra a infecção pelo herpes simples. Diversos tipos de vacinas foram avaliados no passado com resultados pouco efetivos, tais como aquelas que utilizaram vírus vivos, porém atenuados, e as que utilizaram subunidades glicoprotéicas. As novas vacinas do tipo DISC, com partículas infectivas incapacitadas para mais de um ciclo replicativo, são desenhadas para combinar a segurança e as vantagens das vacinas que utilizam vírus atenuados com a imunogenicidade das que usam vírus vivos. Nas vacinas DISC utiliza-se um vírus cujo gene para a glicoproteína H foi removido. Torna-se, assim, capaz de infectar células humanas, exatamente como o vírus natural, mas sua progênie não pode mais completar o ciclo replicativo. São partículas virais não patogênicas, capazes de induzir ampla resposta de linfócitos T citotóxicos e da imunidade humoral contra antígenos herpéticos.

Palavras-chave: herpes simples; glicoproteínas; vacinas; vacinas virais; terapia de genes.

Summary: *Antitherpetic vaccines are administered to either act as a prophylactic or therapeutic against herpes simplex infection. Several kinds of vaccines have been evaluated but with little result, such as live-attenuated viral vaccines and subunit glycoprotein vaccines. The new disabled infectious single cycle (DISC) vaccines are designed to combine the safety and advantages of inactivated vaccines with the immunogenic activity of live viral vaccines. The gene for glycoprotein H was removed to disable the virus that can infect human cells much the same as native virus and viral progeny are produced but are defective and can no longer replicate. These viral particles are nonpathogenic and are capable of inducing broad cytotoxic T-cell and humoral response against herpetic antigens.*

Key-words: *herpes simplex; glycoprotein; vaccines; viral vaccines; gene therapy.*

INTRODUÇÃO

As relações desenvolvidas entre os diversos vírus e seus hospedeiros naturais são bastante complexas. Os vírus têm que resolver um curioso paradoxo evolutivo, pois, para subsistir, dependem dos hospedeiros, por cujo sistema imunológico são, entretanto, constantemente agredidos. A solução para muitos dos vírus é a chamada coevolução. O

INTRODUCTION

The relationships developed between the diverse viruses and their natural hosts are quite complex. The viruses have to resolve a curious evolutionary paradox, since in order to subsist they depend on their hosts, yet are constantly attacking their immunological system. The solution for many of the viruses is the so-called coevolution.

Recebido em 13.08.2001. / *Received in August, 13th of 2001.*

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 17.04.2002. / *Approved by the Consultive Council and accepted for publication in April, 17th of 2002.*

* Trabalho realizado no Sealy Center for Vaccine Development. University of Texas Medical Branch (UTMB) at Galveston/ Texas - USA. / *Work done at Sealy Center for Vaccine Development. University of Texas Medical Branch (UTMB) at Galveston/ Texas - USA.*

¹ Pós-Doutorado em Imunodermatologia e Biologia Molecular pela University of Texas. Mestre e Doutor em Dermatologia pela UFRJ. Licenciado da UFRJ e UNIG. / *Post-Doctorate in immunodermatology and molecular biology, University of Texas. Masters and Ph.D. in Dermatology, UFRJ. Licensed by UFRJ and UNIG.*

vírus do herpes simplex (HSV) é, talvez, o exemplo mais claro desse processo coevolutivo, causando eventuais recorrências que permitem sua disseminação, porém de forma branda o suficiente para conviver com o hospedeiro humano durante toda a vida.¹

O HSV é um DNA-vírus de grandes dimensões (150-250nm) que apresenta quatro componentes básicos; a estrutura helicoidal de DNA em dupla hélice, envolvida por capsídeo icosaédrico e circundada por substância amorfa (tegumento) e membrana lipídica mais externa (envelope). Apresenta duas cepas distintas, o HSV-1 e o HSV-2 responsáveis pelos quadros extragenitais e perigenitais, respectivamente, do herpes simples.^{1,2}

A transmissão do HSV ocorre ao longo das superfícies mucosas ou das soluções de continuidade na pele. Sítios susceptíveis incluem a mucosa oral, ocular, genital e anal. O HSV-2 tem como via preponderante de contágio a relação sexual ou o canal do parto, nas gestantes infectadas. Os herpes-vírus não penetram com eficiência o epitélio queratinizado. Seu ciclo de replicação é curto, provocando efeito citopático em queratinócitos e fibroblastos em período que varia de 48 a 72 horas. Pode, no entanto, estabelecer infecção latente nos gânglios sensitivos durante décadas.²

O envelope viral permite a expressão integral das sete glicoproteínas de superfície importantes na infectividade dos herpes-vírus: gB, gC, gD, gE, gG, gH e gI (Tabela 1). Cada uma delas congrega, na verdade, um complexo glicoprotéico específico, com diferentes pesos moleculares e sítios de glicosilação próprios, capaz de conferir identidade antigênica e biológica ao vírus.^{1,2,3}

Algumas glicoproteínas apresentam importância crítica quanto à resposta imunológica anti-HSV. As glicopro-

Herpes simplex virus (HSV) is perhaps the clearest example of this coevolution process, causing eventual recurrences that enable its dissemination, however in a sufficiently mild manner that it is able to coexist throughout the human host's life.¹

HSV is a DNA-virus of major dimensions (150-250nm) that presents four basic components: the helical structure of DNA in double helix, within an icosahedral capsid, surrounded by amorphous substance (tegument), and with an outer lipid membrane (envelope). It presents two different strains, HSV-1 and HSV-2 responsible respectively for the extragenital and perigenital pictures of herpes simplex.^{1,2}

The transmission of HSV occurs along the mucous surfaces or the continuity solutions in the skin. Susceptible sites include the oral, ocular, genital and anal mucosa. HSV-2 has as preponderant route of infection via sexual relationships or the delivery canal of infected mothers. Herpes viruses can not efficiently penetrate the keratinized epithelium. Their replication cycle is short, provoking a cytopathic effect in keratinocytes and fibroblasts during a period that varies from 48 to 72 hours. They can, however, establish a latent infection in sensitized ganglions which persists for decades.²

The viral envelope allows the integral expression of seven important surface glycoproteins in the infectivity of herpes-viruses: gB, gC, gD, gE, gG, gH and gI (Table 1). In fact, each one of these congregates a specific glycoprotein compound, with varying molecular weights and their own sites of glycosylation, capable of conferring an antigenic and biological identity to the virus.^{1,2,3}

Some glycoproteins present critical importance regarding the immunological anti-HSV response.

Tabela 1: Glicoproteínas de superfície do HSV / Table 1: Surface glycoproteins of HSV

Glicoproteína / Glycoprotein	Função biológica / Biological Function
gB	Adsorção e penetração na célula, liberação de novos vírions / Adsorption and penetration into cell, release of new virions
gC	Adsorção e penetração na célula, liberação de novos vírions, neurotropismo / Adsorption and penetration into cell, release of new virions, neurotropism
gD	Adsorção e penetração na célula, liberação de novos vírions, epidermotropismo / Adsorption and penetration into cell, release of new virions, epidermotropism
gE	Receptor para fração Fc da IgG anti-HSV, neurotropismo / Receptor for Fc fraction of anti-HSV IgG, neurotropism
gG	Distinção antígenica entre as duas cepas, epidermotropismo / Antigenic distinction between the two strains, epidermotropism
gH	Receptor para o fragmento C3b do complemento / Receptor for C3b fragment of complement
gI	Receptor para fração Fc da IgG anti-HSV, neurotropismo / Receptor for Fc fraction of anti-HSV IgG, neurotropism

teínas gE e gI codificam receptores para a fração Fc da IgG, enquanto a gH atua como receptor para o fragmento C3b do complemento.³ Quando atuam em conjunto, protegem a célula infectada da citólise mediada por anticorpos, ajudando a entender por que a presença de anticorpos anti-HSV não se correlaciona, necessariamente, com proteção contra a moléstia.

As glicoproteínas gB, gC e gD parecem ser, no entanto, indispensáveis para a replicação viral nas células infectadas, participando da adsorção às moléculas de heparan sulfato e penetração na membrana celular, além da liberação de vírions.^{3,4} Mutações virais, com translocação no gene codificador da gB, produzem vírions não infecciosos. Quando a translocação afeta a gB e gD conjuntamente, o vírion efetua a adsorção, mas não penetra a célula.⁴ Assim sendo, essas três glicoproteínas são o alvo das vacinas anti-herpéticas que pretendem ser imunogênicas e efetivas.^{4,5,6}

Vacinação anti-herpética em perspectiva

As vacinas são um importante aliado da moderna medicina contra as moléstias infecciosas. Diversas doenças foram controladas, ou mesmo erradicadas, graças à introdução da imunização ativa há 200 anos. É notória a erradicação obtida com relação à varíola, além do relativo controle de sarampo, hepatite e coqueluche. Muitas infecções permanecem, no entanto, resistentes às tentativas de controle pela imunização, tais como o herpes simples, tuberculose, hanseníase, esquistossomose e a meningite bacteriana.⁷

As primeiras tentativas de vacinação anti-herpética utilizavam o vírus morto ou atenuado, após sucessivas passagens em cultura de células. Eram as chamadas "vacinas de primeira geração" e predominaram até o fim da década de 1970. Seguiram-se as "vacinas de segunda geração", valendo-se da observação de que as glicoproteínas de superfície apresentavam potencial imunogênico e grande especificidade biológica.

Existem duas concepções diferentes quanto ao real valor da vacinação anti-herpética. A primeira sugere que a vacinação teria que se concentrar nos indivíduos ainda não infectados, de preferência na população infantil. A outra perspectiva envolve a vacinação dos indivíduos infectados visando transformá-los em portadores sãos da infecção pelo HSV.⁷ É possível que a primeira estratégia viabilize o controle da moléstia em algumas décadas, bloqueando o ciclo de transmissão a novos hospedeiros, mas é na segunda abordagem que se localizam quase todos os esforços atuais no controle da infecção herpética.

Os componentes da subfamília *Alphaherpesviridae*, em que se inclui o HSV-1 (herpes extragenital), HSV-2 (herpes genital) e o VZV, representam, no entanto, um problema especial no desenvolvimento de vacinas específicas, pois permanecem latentes no tecido nervoso, que tem mínima capacidade de expressão antigênica.^{2,7} A proteção física

Glycoproteins gE and gI codify receptors for the Fc fraction of IgG, while gH acts as a receptor for the C3b fragment of the complement.³ When they act together, they protect the infected cell from the cytolysis mediated by antibodies, which helps to explain why the presence of anti-HSV antibodies is not necessarily correlated with protection against the disease.

Glycoproteins gB, gC and gD, however, appear to be indispensable for viral replication in the infected cells, participating in the adsorption of heparan sulfate molecules and penetration into the cellular membrane, as well as the release of virions.^{3,4} Viral mutations, with translocation in the gene encoder of gB, produce noninfectious virions. When the translocation affects gB and gD jointly, the virion effects the adsorption, but it does not penetrate the cell.⁴ Consequently, these three glycoproteins are the target of the antiherpetic vaccines, which are intended to be immunogenic and effective.^{4,5,6}

Antiherpetic vaccination in perspective

Vaccines are an important ally of modern medicine against infectious diseases. Several diseases have been controlled or even eradicated thanks to the introduction of immunization some 200 years ago. The successful eradication of smallpox is well-known, besides the relative control of measles, hepatitis and whooping cough. However many infections have continued resistant to control attempts through immunization, such as herpes simplex, tuberculosis, leprosy, schistosomiasis and bacterial meningitis.⁷

The first attempts to develop an anti-herpetic vaccination used killed or attenuated virus, after successive passages in cell cultures. These were denominated "first-generation vaccines" and their use prevailed until the end of the 1970's, when they were superseded by the "second-generation vaccines". These were based on the fact that surface glycoproteins present great immunogenic potential and biological specificity.

There are two different conceptions as to the real value of the antiherpetic vaccination. The first suggests that vaccination would have to be concentrated among individuals that have not yet been infected and preferably in the infant population. The other perspective involves the vaccination of infected individuals, seeking to transform these into healthy bearers of HSV infection.⁷ It is possible that the former strategy would enable the control of the disease within a few decades, by blocking the transmission cycle to new hosts, but almost all the current efforts to control herpetic infection are being concentrated on the second approach.

However, components of the Alphaherpesviridae subfamily, which includes HSV-1 (extragenital herpes), HSV-2 (genital herpes) and VZV (Varicella Zoster Virus), present a special problem in the development of specific vaccines, since they remain latent within the nervous tissue, which has a minimal capacity of antigenic expression.^{2,7} The physical and immunological protection that the

e imunológica que o sistema nervoso proporciona segrega a parcela da população viral que não se ativa no momento de uma recorrência clínica. Admite-se que algumas poucas PFUs (*plaque form units*) sejam suficientes para deflagrar o herpes recidivante enquanto o potencial infectivo da população neuronal latente é de alguns milhões de PFUs.⁴ Qualquer pessoa infectada pelos herpes-vírus, virtualmente 95% da população humana, seria facilmente morta por uma reativação maciça de todo seu estoque viral, mas esse fato raramente acontece. A coevolução vírus/hospedeiro cria um binômio indissolúvel para o HSV, pois a morte do hospedeiro exterminaria também o próprio vírus.

Além disso, o HSV é capaz de impedir a ação da IgG anti-HSV e da ativação em cascata do complemento por meio de suas glicoproteínas de superfície, especificamente a gE, gI e gH³. Essa capacidade biológica fez com que muitos pesquisadores do passado não acreditassem na viabilidade de uma vacina anti-herpética, pois, mesmo que anticorpos específicos fossem gerados, não conseguiriam lisar a célula infectada.

Mesmo assim uma vacina profilática efetiva seria extremamente útil antes da introdução de imunossuppressores e corticoesteróides, bem como nas fases iniciais de doenças imunodepressoras, como câncer, colagenoses e Aids. Esses pacientes, soronegativos para o HSV e ainda com um sistema imunológico operante, seriam imunizados profilaticamente contra o vírus. Linfócitos circulantes de memória providenciariam a produção de anticorpos específicos para o HSV mesmo em fases avançadas dessas condições mórbidas. O surgimento da Aids, o uso generalizado de corticoesteróides e imunossuppressores, além do número cada vez maior de receptores de transplantes, ajudaram a estimular a procura de uma vacina anti-herpética específica.

As primeiras vacinas

Frank⁸ tentou, já em 1938, efetuar a imunização com o HSV inativado em formalina, observando resultados discretos. Outros estudos similares foram efetuados posteriormente, mas os critérios de melhora clínica foram mal definidos e faltavam os grupos controle utilizando um placebo. O primeiro estudo caso controle sério, envolvendo o acompanhamento da coorte em estudo por até 36 meses, foi efetuado por Kern & Schiff.⁹ Eles observaram que a melhora no grupo que recebeu o HSV inativado foi de 70%, sendo menor do que a melhora clínica relatada entre os que receberam apenas o placebo (76%). A concepção na época da publicação desse material era de que vacinas anti-herpéticas não funcionariam porque as gEs e gIs impediriam a atuação dos anticorpos anti-HSV. A gH também atuaria bloqueando a ação citotóxica do sistema complemento contra as células doentes (Tabela 1).

Muita discussão acompanhou as avaliações epidemiológicas envolvendo a vacina anti-HSV-1 com vírus inativado pelo calor, a chamada vacina Lupidon. Dundarov e cols.¹⁰ descreveram um intervalo maior entre as recorrên-

nervous system provides segregates the portion of the viral population that is not activated at the moment of clinical recurrence. It is admitted that just a few PFUs (plaque form units) are sufficient to trigger recurrent herpes, while the infective potential of the latent neuronal population is in the order of several millions of PFUs.⁴ Such that anybody infected by the herpes-viruses, virtually 95% of the human population, would be easily killed by a complete reactivation of their entire viral stock, but this event rarely occurs. The coevolution of virus/host creates an indissoluble binomial for HSV, since the death of the host would also exterminate the virus itself.

Furthermore, HSV is capable of impeding the action of anti-HSV IgG and of activation in cascade of the complement through its surface glycoproteins, specifically gE, gI and gH³. This biological capacity has led many researchers in the past to doubt the viability of an anti-herpes vaccine, because, even if specific antibodies were generated, they would not be able to lyse the infected cell.

Nevertheless, an effective prophylactic vaccine would be extremely useful before the introduction of immunosuppressants and corticosteroids, as well as in the initial phases of immunodepressant diseases, such as cancer, collagenosis and Aids. Those patients seronegative for HSV and still with an effective immunological system, would gain a prophylactic immunization against the virus. Circulating memory lymphocytes would provide the production of specific antibodies for HSV, even in advanced phases of these morbid conditions. The appearance of Aids and the widespread use of corticosteroids and immunosuppressants, together with the ever increasing numbers of transplants, has helped to stimulate the search for a specific anti-herpes vaccine.

The first vaccines

In 1938, Frank⁸ was already trying to achieve immunization with HSV inactivated in formalin, but with little result. Similar studies were made later, but the criteria of clinical improvement were poorly defined and lacked control groups using a placebo. The first controlled study case, involved a cohort follow-up study for up to 36 months, by Kern & Schiff.⁹ They observed that the improvement in the group that received inactivated HSV was 70%, which was less than the clinical improvement reported by those that only received the placebo (76%). The conception at the time when this material was published was that the antiherpetic vaccine would not work because the gEs and gIs would impede the role of the anti-HSV antibodies. The gH would also act by blocking the cytotoxic action of the complement system against the sick cells (Table 1).

Considerable discussion accompanied the epidemiologic evaluations involving the anti-HSV-1 vaccine with heat-killed virus, which was denominated the Lupidon vaccine. Dundarov and cols.¹⁰ described a longer interval between

cias, nos indivíduos vacinados, mas essas avaliações foram criticadas por não ter padronizado as vias de administração da vacina, além de haver diversidade muito grande na população estudada.

A primeira evolução real na imunoprofilaxia contra o HSV ocorreu, curiosamente, por razões erradas. Durante a década de 1970, acreditava-se que o HSV-2 poderia ser a causa ou um co-fator importante para o desenvolvimento do carcinoma do colo do útero. Sabe-se hoje que essa função cabe às cepas oncogênicas do HPV, mas, considerando as dúvidas existentes na época, procurou-se sintetizar uma nova vacina anti-herpética que congregasse apenas porções virais importantes na imunogenicidade, evitando, porém, o uso de todo o vírus. Skinner¹¹ sintetizou uma vacina que leva seu nome, em que misturou diversas dessas glicoproteínas, mas não obteve os resultados esperados. Ainda faltavam modelos animais que se assemelhassem ao herpes simples humano e maiores conhecimentos sobre a função da cada glicoproteína de superfície do HSV. Estavam lançadas, no entanto, as bases para as vacinas glicoprotéicas de "segunda geração".

As vacinas de segunda geração

As vacinas glicoprotéicas só se tornaram realidade depois que Stanberry e cols.¹² descobriram, em 1991, que os porcos-da-guiné apresentavam sintomatologia clínica e recorrências ao HSV-2 que mimetizavam o quadro do herpes genital em humanos. De forma concomitante, os avanços na biologia molecular permitiram sintetizar, *in vitro*, glicoproteínas virais. O seqüenciamento completo do genoma do HSV permitiu a clonagem de suas porções extracelulares, deixando-se para trás as porções transmembrana e citoplasmática, que não são imunogênicas.

As glicoproteínas gB e gD do HSV são fundamentais na estimulação da imunidade celular específica, ativando a população de linfócitos citotóxicos.⁵ Vacinação em cobaias soronegativas para o HSV-1, com um concentrado de glicoproteínas do vírus, sensibilizou linfócitos T a reconhecer a gB e gD, e apresentou ação profilática contra a infecção herpética.^{13,14} Corey e cols.¹⁵ desenvolveram o primeiro estudo multicêntrico com uma vacina baseada nessas duas glicoproteínas e observaram altos títulos de anticorpos neutralizantes específicos para o HSV-2, mas não uma redução significativa da frequência das recorrências. É provável que a falha parcial se deva à via de inoculação intramuscular utilizada, que pouca ou nenhuma correlação guarda com as vias naturais de infecção do HSV.¹⁶ Outra possibilidade é a de que a glicoproteína gerada *in vitro* fosse uma variante estruturalmente diversa da gB e gD, em que as cadeias alfa e beta se distribuíam de forma diversa do observado na versão *in vivo*. Sabe-se hoje, após o reconhecimento dos príons, que muitas das propriedades fisiológicas e imunogênicas de uma proteína dependem não só de sua seqüência de aminoácidos, mas de sua conformação espacial.

recurrences among vaccinated subjects, but these evaluations were criticized for not having standardized the method by which the vaccines were administered and also because there was a very large diversity in the population studied.

The first real evolution in the immunoprophylaxis against HSV occurred, surprisingly, for the wrong reasons. During the 1970's, it was believed that HSV-2 could be the cause or at least an important co-factor in the development of cervical cancer. It is known today that oncogenic strains of HPV (Human Papilloma Virus) are responsible for this function, but considering the existence of doubts at that time, attempts were made to synthesize a new antiherpetic vaccine that congregated only those viral portions that are important in the immunogenicity, while avoiding the use of the entire virus. Skinner¹¹ synthesized a vaccine that bears his name, in that it combined several of these glycoproteins, however he did not obtain the expected results. There was still a lack of animal models that were similar to human herpes simplex and knowledge regarding the function of each glycoprotein in the surface of HSV. Nevertheless, the foundations had been laid for the "second-generation" glycoprotein vaccines.

The second-generation vaccines

*Glycoprotein vaccines only became a reality after 1991, when Stanberry and cols.¹² discovered, that guinea pigs presented clinical symptomatology and recurrence in HSV-2 comparable to the picture of genital herpes in humans. Concomitantly, progress in molecular biology allowed the *in vitro* synthesis of viral glycoproteins. While complete sequencing of the HSV genome enabled the cloning of their extracellular portions, thus leaving out the transmembrane and cytoplasmatic portions, which are not immunogenic.*

*Glycoproteins gB and gD of HSV are fundamental in the stimulation of specific cellular immunity by activating the population of cytotoxic lymphocytes.⁵ Vaccination of seronegative guinea pigs against HSV-1, with a concentrate of glycoproteins from the virus sensitized the T lymphocytes to recognize gB and gD and presented a prophylactic action against the herpetic infection.^{13,14} Corey and cols.¹⁵ developed the first multicenter study with a vaccine based on both these glycoproteins and observed high titers of specific neutralizing antibodies for HSV-2, though without a significant reduction in the frequency of recurrences. It is probable that the partial flaw was due to the intramuscular inoculation path used, which has little or no correlation with the natural means of infection by HSV.¹⁶ Another possibility is that the glycoprotein generated *in vitro* was a structurally diverse variant of gB and gD, in that the alpha and beta chains were distributed in a different manner than that observed in the *in vivo* version. It is known today, after recognition of the prion proteins, that many of the physiologic and immunogenic properties of a protein depend not only on their sequence of amino acids, but also on their spatial form.*

Outra concepção diferente da vacinação anti-herpética é a terapêutica, com imunização direcionada aos indivíduos já infectados, permitindo imaginar o uso de anticorpos bloqueadores das glicoproteínas envolvidas na adsorção do HSV à membrana celular (gB e gD).¹⁷ Seriam úteis, também, anticorpos contra as glicoproteínas associadas com a liberação dos vírions pela célula infectada (gB e gH), transformando o hospedeiro em um portador sã da moléstia. Straus e cols.^{18,19} avaliaram 98 doentes, que experimentavam a média de 10 recorrências/ano, submetendo-os à vacina com gD recombinante. As crises tornaram-se muito menos freqüentes (média de quatro recorrências/ano) no grupo imunizado. Dados semelhantes foram observados por Skinner e cols.,¹¹ Stanberry^{20,21} e Whitley²² quanto à redução do número de recorrências e sua gravidade, em acompanhamento clínico de até 12 anos. Erturk e cols.²³ destacam a proteção cruzada para o HSV-2 obtida após imunização com gD HSV-1, fato explicado pela semelhança antigênica de ambas as cepas. Lupi não conseguiu detectar essa proteção vacinal entre os sorotipos do HSV em estudo epidemiológico na população brasileira.¹

Os modelos animais observados por Stanberry¹² nos porcos-da-guiné revelaram que fatores exógenos influenciam a eficácia das vacinas glicoprotéicas, incluindo a diluição, a freqüência da vacinação e a glicoproteína utilizada. Um fator importante parece ser o adjuvante escolhido. Trata-se de imunógenos potentes, tais como o muramil-tripeptídeo e o adjuvante de Freund, e ajudam a reforçar a capacidade imunogênica das vacinas. O hidróxido de alumínio, adjuvante barato e de fácil obtenção, é ineficaz contra o HSV.⁵

É mais comum a existência de portadoras assintomáticas genitais do HSV-2 do que do sorotipo HSV-1, havendo também preponderância do HSV-2 nas recidivas sintomáticas e nos casos de herpes neonatal.²² Esses fatos sugerem maior virulência do HSV-2 na localização perigenital, fato que também trará conseqüências em relação a uma vacina específica. As vacinas de "segunda geração" já passaram pelos ensaios das fases I e II, com cobaias, e já se encontram em fase avançada de estudo clínico em voluntários com herpes genital recorrente.^{15,24,25} Apesar dos resultados encorajadores, apresentam algumas restrições, como potência imunogênica reduzida e durabilidade curta. Seu custo e eficácia ainda não se comparam aos da terapêutica supressiva utilizando os análogos dos nucleosídeos.

As vacinas gênicas

As vacinas gênicas ou de DNA, ainda em fase de padronização, vêm-se tornando extremamente úteis no combate à infecção pelo HSV.²⁶ A vacina DISC (*disabled infectious single cycle*) foi desenvolvida com partículas infectivas incapacitadas para mais de um ciclo replicativo.²⁷ Uma cepa do HSV foi modificada, por meio de enzimas de restrição Bam HI e Not I, de forma a deletar a seqüência

Another concept different from the anti-herpetic vaccination is the therapeutic, with immunization addressed to already infected individuals, allowing one to imagine the use of blocking antibodies of the glycoproteins involved in the adsorption of HSV to the cellular membrane (gB and gD).¹⁷ Also useful would be antibodies against the glycoproteins associated with the liberation of virions by the infected cells (gB and gH), transforming the host into a healthy bearer of the disease. Straus and cols.^{18,19} evaluated 98 patients, that were undergoing a mean 10 recurrences/year, submitting them to a vaccine with recombinant gD. The crises became much less frequent (mean of four recurrences/year) in the immunized group. Similar data were observed by Skinner and cols.,¹¹ Stanberry^{20,21} and Whitley²² in terms of the reduction in the number of recurrences and their gravity, during a clinical follow-up of up to 12 years. Erturk and cols.²³ underscored the cross protection for HSV-2 obtained after immunization with gD HSV-1, a fact explained by the antigenic similarity between both strains. Lupi did not manage to detect such a vaccinal protection for the serotypes of HSV in an epidemiological study of the Brazilian population.¹

The animal models observed by Stanberry¹² using guinea pigs revealed that exogenous factors influence the effectiveness of the glycoprotein vaccines, including the dilution, frequency of the vaccination and glycoprotein used. An important factor appears to be the adjuvant chosen. These are potent immunogens, such as muramil-tripeptide or Freund's adjuvant, and they help to reinforce the immunogenic capacity of the vaccines. It should be noted that while aluminum hydroxide is a cheap and easily obtained adjuvant, it is ineffective against HSV.⁵

It is more common for patients with serotype HSV-2 to be asymptomatic in the genitals than their counterparts with HSV-1, there is also a preponderance of HSV-2 among symptomatic recurrences and cases of neonatal herpes.²² These facts suggest a greater virulence of HSV-2 in the perigenital region, a fact that likewise bears consequences in relation to a specific vaccine. The "second-generation" vaccines have already been submitted to phases I and II trials, with guinea pigs, and have now reached the advanced phase of clinical study in volunteers with recurrent genital herpes.^{15,24,25} In spite of the encouraging results, they present some restrictions, such as reduced immunogenic potency and short durability. Their cost and effectiveness can not yet be compared to those of suppressive therapeutics, using analogs of the nucleosides.

Gene vaccines

Gene or DNA vaccines, although still in the standardization phase, are becoming extremely useful in the combat against infection by HSV.²⁶ The DISC (disabled infectious single cycle) vaccine was developed with infective particles inactivated by more than one replicative cycle.²⁷ A strain of HSV was modified, through restriction enzymes Bam HI and Not I, in such a way as to delete the

genômica codificadora da gH.²⁸ Esse HSV defeutivo é cultivado em células Vero, derivadas de células renais de macacos verdes africanos, previamente modificadas para expressar em sua superfície a gH.^{29,20} A posterior liberação dos vírions DISC pela célula sîmia produz progênies estruturalmente similar à de um vírion normal do HSV, mas incapaz de produzir todo o ciclo da doença no paciente vacinado.³⁰ Em suma, é um vírus não patogênico, mas capaz de induzir resposta imunológica celular e humoral exatamente como o vírus selvagem sem os riscos incluídos neste último.

A vacina DISC apresenta diversas vantagens interessantes no processo de imunização. Os vírions são incapazes de produzir doença devido à deleção de um gene essencial e podem, portanto, ser inoculados em grande quantidade utilizando-se as mucosas como via de administração,^{31,32} reproduzindo a via normal de infecção do HSV. Após a inoculação, os vírus DISC induzirão resposta imunológica contra todas as diversas glicoproteínas do envelope do HSV, exceto o gH, e não para algumas poucas pré-selecionadas, como no caso das "vacinas de segunda geração". A opção pela gH deve-se ao fato de essa glicoproteína ser fundamental na estratégia viral de proteção à célula infectada (Tabela 1); mediante a inibição da cascata de complemento o HSV consegue impedir a citólise imediata do queratinócito infectado, ganhando tempo para promover todo o seu ciclo de replicação parasitário.

Após a imunização, o material genético do HSV é incorporado às células apresentadoras de antígenos, tais como macrófagos e células dendríticas. As partículas do DNA endocitadas, complexadas as moléculas de classe II, do HLA, migram para a superfície celular.^{31,33} Esses peptídeos de membrana são reconhecidos e ativam a subpopulação de linfócitos T CD4+, cuja principal função é a liberação do γ -interferon, molécula dotada de ação antiviral e capaz de recrutar novos linfócitos e macrófagos. Outra parte dos antígenos produzidos não será processada na membrana celular, sendo secretada para fora da célula e estimulando linfócitos B na produção de anticorpos específicos.³³ Assim sendo, as vacinas gênicas têm o potencial de estimulação da imunidade celular e humoral, sem os riscos associados às vacinas com organismos vivos.

Animais vacinados com o HSV-1 DISC mostraram proteção estatisticamente significativa contra primoinfecção herpética e quadros recorrentes. Resultados semelhantes foram observados no modelo animal utilizando o HSV-2 DISC (10^7 PFU), com redução de 98,6% na moléstia recorrente ($p < 0.0001$).^{30,32} Os porcos-da-guiné demonstraram proteção total contra a primoinfecção pelo HSV. A proteção contra os sintomas da moléstia chegaram 100% após o segundo e terceiro reforços ($p < 0.0001$ em ambos os casos).^{32,33}

Uma segunda variante do HSV DISC também vem sendo testada nas situações em que os genes virais ICP-27 e ICP-28 são deletados.³⁴ As proteínas codificadas por ambos são fundamentais nas fases mais tardias do ciclo de replicação do HSV. Vacinas gênicas DISC utilizando essa

genomic coding sequence of the gH.²⁸ This defective HSV is cultivated in Vero cells, derived from the renal cells of African green monkeys, previously modified to express gH on their surface.^{29,20} The subsequent release of the DISC virions by the simian cell produces a structurally similar progeny to that of a normal HSV virion, but which is unable to produce the complete cycle of the disease in a vaccinated patient.³⁰ In short, although it is a nonpathogenic virus, it is capable of inducing cellular immunological and humoral response exactly like the wild virus, but without the risks associated with the latter.

The DISC vaccine presents several interesting advantages in the immunization process. The virions are unable to produce disease due to the deletion of an essential gene and therefore they can be inoculated in great quantities, using the mucous membranes as the administration route,^{31,32} thus reproducing the normal means of infection by HSV. After inoculation, the DISC viruses induce an immunological response against the entire gamut of glycoproteins in the HSV envelope, except gH, and not just for a few pre-selected ones, as in the case of the second-generation vaccines. The option for gH is due to the fact that this glycoprotein is fundamental in the viral protection strategy for the infected cell (Table 1); through inhibition of the complement cascade, HSV manages to impede an immediate cytolysis of the infected keratinocyte, thereby gaining time to promote its complete cycle of parasitic replication.

After immunization, the genetic material of HSV is incorporated into the antigen presenter cells, such as macrophages and dendritic cells. The particles of the endocytosed DNA, complexed to the class II molecules, of the HLA, migrate to the cellular surface.^{31,33} These peptide membranes are recognized and activate the subpopulation of CD4+ T lymphocytes, whose main function is the release of γ -interferon, a molecule endowed with antiviral action and capable of recruiting new lymphocytes and macrophages. Another part of the antigens produced would then not be processed in the cellular membrane, being secreted outside of the cell and stimulating B lymphocytes into the production of specific antibodies.³³ Consequently, the gene vaccines have the potential of stimulating cellular and humoral immunity, without the risks associated with vaccines containing live organisms.

Animals vaccinated with DISC HSV-1 showed a statistically significant protection against herpetic primary infection and recurrent pictures. Similar results were observed in the animal model using DISC HSV-2 (10^7 PFUs), with a 98.6% reduction in recurrent disease ($p < 0.0001$).³⁰⁻³² Guinea-pig models demonstrated total protection against primary infection by HSV. Protection against the symptoms of the disease reached 100% after the second and third reinforcements ($p < 0.0001$ in both cases).^{32,33}

A second variant of DISC HSV has also been tested in situations in which the viral genes ICP-27 and ICP-28 are deleted.³⁴ The proteins codified by both are fundamental in the latest phases of the cycle of replication of HSV. Genic

variante permitem a replicação do vírus até uma certa etapa; as proteínas virais que chegam a ser codificadas são suficientes para estimular uma resposta imune específica.

CONCLUSÃO

As vacinas anti-herpéticas ainda não são uma realidade disponível para o uso clínico rotineiro, mas seu estudo tem contribuído de forma decisiva para o surgimento de novas tecnologias em imunoprofilaxia. As correlações entre o HSV e o hospedeiro humano também são muito mais bem entendidas atualmente, abrindo caminho para novas formas de tratamento das moléstias virais. □

DISC Vaccines using this variant allows replication of the virus up to a certain stage; the viral proteins that were codified are sufficient to stimulate a specific immune response.

CONCLUSION

Anti-herpetic vaccines are still not a reality available for routine clinical use, but research into these has been contributing in a decisive manner to the appearance of new technologies in immunoprophylaxis. The correlations between HSV and the human host are also much better understood now, making progress towards new forms of treating viral diseases. □

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido com o auxílio de bolsa de pós-doutorado no exterior (PDE) concedida pelo CNPq (processo 200868/00-4), bem como de licença remunerada concedida pela UFRJ e UNIG.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was developed with PDE [Post-Doctorate Abroad] funding conceded by CNPq (process 200868/00-4), as well as remunerated license from UFRJ and UNIG.

REFERÊNCIAS / REFERENCES

- Lupi O. Herpes Simples e Infecção pelo vírus da Imunodeficiência Humana: Análise de 650 Pacientes. Tese de Doutorado em Dermatologia - Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1998.
- Lupi O. Herpes simples. *An Bras dermatol* 2000;75(3):261-77.
- Lupi O, Pereira Jr AC. Herpesvírus humanos, considerações estruturais e imunopatogênicas. *An Acad Nac Med* 1994;125:27-9.
- Ashley RL, Corey L, Dalessio J, *et al.* Protein-specific antibody responses to primary genital HSV type 2 infections. *J Infect Dis* 1994;170:20-6.
- Byars NE, Fraser EB, Peczyk RA, *et al.* Vaccinating guinea pigs with recombinant glycoprotein D of HSV in an efficacious adjuvant formulation elicits protection against vaginal infection. *Vaccine* 1994;12(3):200-9.
- Langenberg AGM, Burke RL, Adair SF, *et al.* A recombinant glycoprotein vaccine for HSV-2: safety and efficacy. *Ann Intern Med* 1995;122:889-98.
- Lupi O Vacinas Anti-herpéticas. In: Lupi O, Silva AG, Pereira Jr AC. Herpes: Clínica, Diagnóstico e Tratamento. Ed Medsi, Rio de Janeiro, 2000.
- Frank SB. Formolized herpes virus therapy and the neutralizing substance in herpes simplex. *J Invest Dermatol* 1938;1:267-82.
- Kern AB, Schiff BL. Vaccine therapy in recurrent herpes simplex. *Arch Dermatol* 1964;89:844-5.
- Dundarov S, Andonov P, Bakalov B, *et al.* Immunotherapy with inactivated polyvalent herpes vaccines. *Develop Biol Standart* 1982;52:351-8.
- Skinner GR, Fink C, Melling J, *et al.* Report of 12 years experience in open study of Skinner herpes simplex vaccine towards prevention of herpes genitalis. *Med Microbiol Immunol* 1992;180(6):305-20.
- Stanberry LR. Evaluation of herpes simplex virus vaccines in animals: the guinea pig vaginal model. *Rev Infect Dis* 1991;13:920-3.
- Nakao M, Hazama M, Mayumi A, *et al.* Immunotherapy of acute and recurrent HSV-2 infection with an adjuvant-free form of recombinant glycoprotein D interleukin -2 fusion protein. *J Infect Dis* 1994;169(4):787-91.
- Zheng B, Graham FL, Johnson DC, *et al.* Immunogenicity in mice of tandem repeats of an epitope from herpes simplex gD protein when expressed by recombinant adenovirus vectors. *Vaccine* 1993;11(12):1191-8.
- Corey L, Langenberg AG, Ashley R *et al.* Recombinant glycoprotein vaccine for the prevention of genital HSV-2 infection. *JAMA* 1999;282(9):331-40.
- Mascola JR. Herpes simplex virus vaccines - Why don't antibodies protect? *JAMA* 1999; 282 (4): 379-80.
- Lupi O & Pereira JR AC. Perspectivas quanto ao desenvolvimento de vacinas antiherpéticas específicas. *F Med (BR)* 1996;113(2):185-7.
- Straus SE, Corey L, Burke RL, *et al.* Placebo-controlled trial of vaccination with recombinant glycoprotein D or herpes simplex virus type 2 for immunotherapy of genital herpes. *Lancet* 1994; 343(8911):1460-3.
- Straus SE, Wald A, Kost RG, *et al.* Immunotherapy of recurrent genital herpes with a recombinant HSV-2 glycoproteins D and B: results of a placebo-controlled vaccine trial. *J Infect Dis* 1997;176:1129-34.
- Stanberry LR. Herpes immunization - on the threshold. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1996;7:120-8.
- Stanberry LR. Herpes simplex virus vaccines as immunotherapeutic agents. *Trends Microbiol* 1995;3(6):244-7.
- Whitley RJ. Neonatal herpes simplex virus infection: is there a role for immunoglobulin in disease prevention and therapy? *Pediatr Infect Dis* 1994;13(5):432-8.
- Erturk M, Phillipotts RJ, Wecch MJ *et al.* Efficacy of HSV-1 ISCOM vaccine in the guinea-pig model of HSV-2 infection.

Vaccine 1991;9(10):728-34.

24. Bournsnel ME, Entwisle C, Blakeley D *et al.* A genetically inactivated HSV-2 vaccine provides effective protection against primary and recurrent HSV-2 disease. *J Infect Dis* 1997; 175: 16-25.

25. Harrison CJ, Miller RL, Bernstein DI. Reduction of recurrent HSV disease using imiquimod alone or combined with glycoprotein vaccine. *Vaccine* 2001;19:1820-6.

26. Aguado T, Bazin H, Rabinovich R, *et al.* International meeting on nucleic acid vaccine for prevention of infectious diseases. *Vaccine* 1996;15(8):7-9.

27. Stephenson JR. Genetically modified viruses: vaccines by design. *Curr Pharm Biotechnol* 2001;2(1):47-76.

28. Forrester A, Farrell H, Wilkinson G *et al.* Construction of a mutant HSV-1 with glycoprotein gH sequences deleted. *J Virol* 1992;66:341-8.

29. Bournsnel ME, Entwisle C, Blakeley D, *et al.* A genetically inactivated herpes simplex virus type 2 (HSV-2) vaccine provides effective protection against primary and recurrent HSV-2 disease. *J Infect Dis* 1997;175(1):16-25.

30. McLean CS, Ni D, Duncan I *et al.* Induction of a protective immune response by mucosal vaccination with a DISC HSV-1 vaccine. *Vaccine* 1996;14:987-92.

31. Eo SK, Gierynska M, Kamar AA *et al.* Prime-boost immunization with DNA vaccine: mucosal route of administration. *J Immunol* 2001;166(9):5473-9.

32. Eo SK, Lee S, Chun S *et al.* Modulation of immunity against HSV infection via mucosal transfer of plasmid DNA encoding chemokines. *J Virol* 2001;75(2):569-78.

33. McLean CS, Erturk M, Jennings R *et al.* Protective against primary and recurrent disease caused by herpes simplex virus (HSV) type 2 using a genetically disabled HSV-1. *J Infect dis* 1994;170(5):1100-9.

34. Fletcher MA. Vaccine candidates in STD. *Int J STD AIDS* 2001;12(7):419-22.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA: / MAILING ADDRESS:

Omar Lupi

**University of Texas Medical Branch (UTMB) - Sealy
Center for Vaccine Development**

**301 University Boulevard - Mary Moody Northern
Pavilion, Room 3.206 Galveston/TX**

Zip Code: 77555-0436 - USA

Tel: +1-409-747-8153 Fax: +1-409-747-8150

E-mail: omrosasa@utmb.edu

lupiomar@hotmail.com