

BMM 160 – Microbiologia Básica para Farmácia

Prof. Armando Ventura

Apostila de Virologia

Vacinas Virais

- As primeiras vacinas e a erradicação da varíola

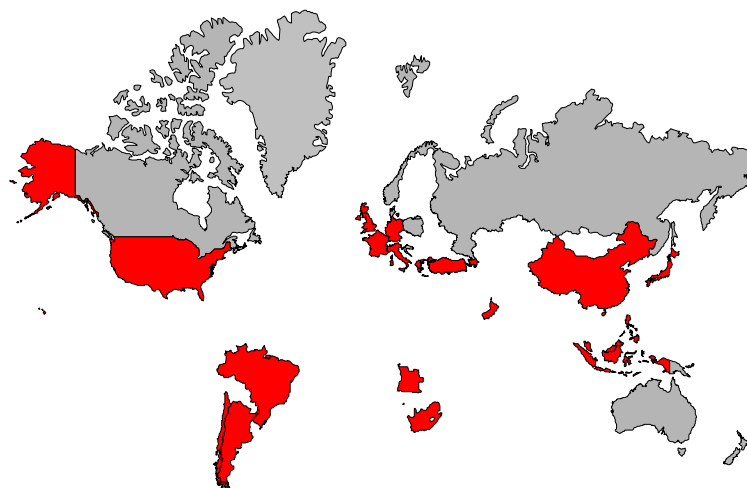
Os vírus da varíola (varíolas major e minor) pertencem ao gênero *Orthopoxvirus* da família dos *Poxviridae*. A varíola é de evolução rápida, após duas semanas de incubação começam os sintomas, culminando com as pústulas na pele, e em 30% dos casos (varíola major) evolução para hemorragia grave e morte. Essa doença assolava a humanidade a milênios, tendo sido o primeiro método de imunização desenvolvido aproximadamente 1000 aC na China. A técnica chamada de variolação consistia em secar o material colhido das pústulas ao sol e pulverizá-lo. Esse material era aplicado fazendo escarificações com objeto pontiagudo na pele de pessoas que viviam em regiões ameaçadas pela epidemia.

Apesar de ser observada uma diminuição dos casos, esse é um procedimento de altíssimo risco pois os vírus contidos no material pustular nem sempre ficavam inativados, levando à doença. No entanto essa prática espalhou-se pelo mundo e por ironia do destino o inglês Edward Jenner, quando criança, contraiu a infecção após uma variolação. Felizmente Jenner sobreviveu, tornou-se médico, e teve sua atenção voltada para a resistência à doença apresentada por ordenhadoras portadoras de lesões similares à varíola, presentes nos úberes das vacas (*cowpox*). Em 1796 fez um experimento, utilizando como cobaia o menino James Phipps, que após variolação com as lesões de *cowpox* resistiu ao desafio com a varíola. Esse novo procedimento mostrou-se seguro e efetivo, dando início à era das vacinas, mas não havia ainda o conhecimento do agente infeccioso, o vírus da varíola.

Vacina é um termo derivado do latim, *vacca* (vaca) e *vaccina* (vindo da vaca), consolidado por Pasteur em referência ao trabalho de Jenner, no qual se baseou para desenvolver uma vacina de caráter experimental contra a bactéria *Pasteurella multocida*, letal para galinhas (1879).

Louis Pasteur e Émile Roux posteriormente desenvolveram a vacina contra a Raiva (uma doença 100% letal), a segunda vacina antiviral da história, produzida em tecido nervoso de coelhos e inativada por secagem. Foi testada pela primeira vez em humanos no garoto Joseph Meister mordido por um cão raivoso, em 1885.

Ao serem descobertos os vírus, o nome científico do “cowpox virus” ficou sendo *variolae vaccinae*. O cultivo desse vírus em larga escala, no dorso de bezerros, foi iniciado em 1805. Em algum momento em meados desse século o vírus *vaccinia* substituiu o cowpox nesse processo de cultivo. A vacinação massiva com o *vaccinia* passou a ser aplicada com a perspectiva de obter uma “imunidade de rebanho” em toda a população.



Áreas endêmicas de varíola em 1945

A partir de 1966 a OMS lançou a nível mundial um programa de contenção para erradicar a varíola, tendo como base o seguinte:

- Ser humano é o único hospedeiro do vírus.
- Diagnóstico eficiente.
- Uma intervenção efetiva para interromper a transmissão era possível.
- Formulação vacinal liofilizada.
- Sistema de inoculação eficiente.
- A identificação dos casos, e a contenção da transmissão vacinando os contatos primários e seus contatos mostrou-se uma **estratégia eficiente** (esquema abaixo).



O paciente Ali Maow Maalin foi último caso registrado de varíola, em 1977 na Somália. No entanto, o vírus continua preservado em freezers nos EUA e Rússia, devido à sua potencial utilização como arma biológica.

Fica a perspectiva de se conseguiremos repetir a proeza da erradicação para outros vírus. Tentamos erradicar a Poliomielite e o Sarampo mas, até o momento, falhamos.

Porque uma vacina é eficiente na prevenção de doenças causadas por microrganismos? As respostas começaram a vir com o desenvolvimento da Imunologia, cujos princípios comentamos brevemente na apostila “Noções de Imunologia”.

- Desenvolvimento das vacinas contra a Poliomielite

Os vírus da poliomielite pertencem ao gênero Enterovirus da família dos *Picornaviridae* (pico=pequeno, ou seja, pequenos vírus com genoma de RNA). Os Enterovirus infectam o trato entérico causando meningites, paralisias, diarreias, e outras sintomatologias.

Apesar do grande número de gêneros e espécies, os membros dessa família apresentam estrutura similar: não possuem envelope, seu capsídeo é de simetria icosaédrica com 27 nm, e o genoma de RNA positivo tem em média 7.500 bases. O capsídeo é constituído pelas proteínas VP1 a VP4, que se unem para formar os capsômeros visíveis à microscopia eletrônica (Fig 8), como comentado na aula de replicação, sobre o grupo IV de Baltimore.

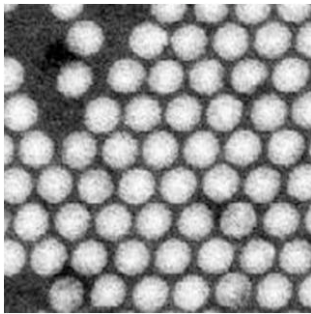


Fig 8.



Fig 9.

Os vírus da poliomielite, causadores da paralisia infantil, eram um gravíssimo problema até o final da década de 1950. À figura 9 temos uma área de um grande hospital da época dedicada à manutenção da respiração em pacientes em estado grave, com os famosos “pulmões de aço”.

Existem três tipos de **poliovírus (pólios 1, 2 e 3)**, para os quais se encontram receptores apenas em células de primatas. Esses vírus apresentam, portanto, uma gama de hospedeiros restrita. Dessa forma, as células de origem humana ou de macacos, são as de escolha para o seu cultivo, a partir de amostras de fezes ou “swabs” de garganta ou reto.

A patogenia provocada pelos poliovírus tem seu início quando o vírus entra pela boca, a **porta de entrada** no organismo. A replicação primária ocorre nos epitélios da faringe e intestinos, sendo que permanecem detectáveis por algumas semanas. Depois de se multiplicarem novamente em gânglios linfáticos em dois a cinco dias, ocorre o aparecimento de vírus no sangue (**viremia**). Em torno de cinco dias após o início da infecção aparecem os primeiros anticorpos, quando o vírus já está instalado nos axônios dos nervos periféricos e começa sua migração para o sistema nervoso central, aonde pode afetar principalmente os neurônios motores inferiores. Assim as manifestações clínicas, depois desse período de incubação de aproximadamente 14 dias, podem ir da poliomielite abortiva (recuperação total, 5% dos casos), passando pela poliomielite não parálitica (com um quadro de meningite asséptica, 1-2% dos casos), e podendo chegar à poliomielite parálitica (0,1-2% dos casos). O tratamento é feito com analgésicos, manutenção da respiração e hidratação, além de fisioterapia. A imunidade adquirida após a infecção é permanente e tipo-específica.

A distribuição dos poliovírus é mundial, sendo as crianças mais suscetíveis, a maioria dos casos ocorre até os cinco anos, e os picos de ocorrência são no verão e outono. A intensidade dessa ocorrência está ligada às condições sanitárias inadequadas, visto que em torno de 90% dos

casos são assintomáticos e a liberação dos vírus nas fezes pode estender-se por até mais de 30 dias. A prevenção começa, portanto, pela melhoria dessas condições.

Esse quadro começou a mudar radicalmente quando em meados da década de 50 após o estabelecimento das culturas celulares em larga escala, foi possível obter grandes quantidades de vírus. A primeira vacina aprovada foi a inativada por formol, desenvolvida pelo grupo de Jonas Salk. Por volta de cinco anos mais tarde, Albert Sabin introduziu a utilização da vacina com vírus vivos atenuados (passaram por um processo de aquisição de mutações, ver adiante), que por apresentar várias vantagens passou a ser a mais utilizada.

As duas formulações contêm os três sorotipos, que no caso da vacina de Sabin são capazes de se multiplicar no epitélio intestinal sem causar doença. Destacam-se dentre as vantagens da vacina atenuada o fato de induzir a produção de anticorpos do tipo IgA que dão proteção ao nível das mucosa, além de proporcionar uma maior duração da imunidade como um todo. Outros pontos positivos são a facilidade de administração (“gotinha”) e o fato de que os vírus vacinais podem se espalhar na comunidade, aumentando o efeito de imunização. Uma desvantagem, entretanto é que durante a multiplicação pode haver reversão do fenótipo (apesar disso ocorrer muito raramente), levando o vírus vacinal a causar doença. Isto pode ser especialmente prejudicial em indivíduos imunodeprimidos, sendo nesses casos recomendada a vacina inativada. Outro ponto negativo da vacina atenuada é de que quando há outros enterovírus, infectando naturalmente o indivíduo no momento da administração, estes interferem impedindo a multiplicação do vírus vacinal. Na tabela abaixo temos uma comparação entre a vacina de Salk e a de Sabin.

Característica	Inativada (Salk)	Atenuada (Sabin)
Previne a doença	Sim	Sim
Induz IgG humoral	Sim	Sim
Induz IgA ao nível intestinal	Não	Sim
Permite uma proteção secundária pela disseminação à comunidade	Não	Sim
Interfere na replicação do vírus selvagem no intestino	Não	Sim
Reverte à virulência	Não	Sim (raramente)
Co-infecção com outros enterovírus compromete a imunização	Não	Sim
Pode causar doença em indivíduos imunocomprometidos	Não	Sim
Via de administração	Injetável	Oral
Requer refrigeração	Não	Sim
Duração da imunidade	Mais curta	Mais longa

- Vacinas virais

Conforme comentado, em Noções de Imunologia, quando o organismo está sendo invadido por um vírus, temos um conjunto de **defesas inespecíficas** que entram em ação: produção de interferons, fagocitose, febre e limpeza mucociliar. De especial interesse em virologia é a indução dos interferons que podem fazer com que a célula adquira um estado

antiviral, bloqueando a síntese de proteínas virais ou levando à degradação dos RNAs virais. As defesas efetivas, no entanto, são as **específicas, imunidade passiva e imunidade ativa**.

Para a prevenção de infecções virais podemos utilizar o princípio de imunidade passiva, administrando imunoglobulinas extraídas do sangue. Um procedimento clássico é a administração do soro anti-rábico obtido de sangue humano ou animal. Outros exemplos estão na tabela a seguir.

Imunoglobulina	Vírus
Humana normal	Sarampo em indivíduos imunocomprometidos Para prevenção da hepatite A
Humana para Hepatite B	Após acidentes de risco (agulhas...), junto com a vacina contra hepatite B
Humana ou animal para Vírus da Raiva	Proteger até que a vacina induza imunidade
Humana para Herpes Zóster	Evitar a multiplicação do Herpes Zoster em imunocomprometidos
Plasma de convalescentes de Febre de Lassa ou Ebola	Tentativa de evitar a progressão da patologia em indivíduos infectados

A imunidade ativa, estimulada pelas vacinas, compõe-se das imunidades humoral e celular, conforme comentado em Noções de Imunologia. O combate aos patógenos intracelulares, como é o caso dos vírus, tem na imunidade celular a componente mais importante, sendo que boa parte das doenças virais não são debeladas quando há presença apenas de anticorpos no soro. Como vimos no caso das vacinas contra a poliomielite, o tipo de vacina pode determinar respostas mais apropriadas, que dependerão da interação de cada vírus com o hospedeiro.

O controle dos vírus animais pela imunização pode ser dividido em vacinas de várias gerações, dependendo do método de obtenção dos antígenos. Esses métodos foram inicialmente baseados no cultivo em animais, passando aos ovos embrionados, culturas celulares e finalmente pela utilização da tecnologia do DNA recombinante. Na tabela abaixo, temos um resumo dessa evolução.

1ª geração animais	2ª geração ovos embrionados	3ª geração cultura celular	4ª geração DNA recombinante
Varíola Raiva	Febre amarela Influenza	Poliomielite Sarampo Caxumba Rubéola	Hepatite B Papiloma “Rotavirus”
Até 1900	Até 1950	Até 1970	Hoje

Atualmente temos uma série de vacinas virais disponíveis, e na tabela a seguir temos as mais conhecidas.

Vacina	Fonte	Tipo	Rota	OBS.
Variola	Linfa de animais	Atenuada	Escarificação no braço	Erradicada
Febre amarela	Ovos embrionados	Atenuada	Intramuscular	Imunização prolongada
Influenza	Ovos embrionados	Inativada	Intramuscular	Em torno de 70% de eficiência (variação)
Pólio	Células diplóides Humanas/macacos	Atenuada	Oral	Alta eficácia
Pólio	Células diplóides Humanas/macacos	Inativada	Intramuscular	Alta eficácia
Sarampo	Células de embrião de galinha	Atenuada	Intramuscular	MMR (vacina triplice) Imunização prolongada 90% de eficiência
Rubéola	Células diplóides Humanas	Atenuada	Intramuscular	MMR (idem)
Caxumba	Células de embrião de galinha	Atenuada	Intramuscular	MMR (idem)
Raiva	Células diplóides Humanas	Inativada	Intramuscular	Administrada pré e pós-infecção
Hepatite B	Levedura	Subunidade	Intramuscular	Recombinante
Papilomavírus (6, 11, 16, 18)	Levedura	Subunidade	Intramuscular	Recombinante
Rotavirus	Células diplóides Humanas	Atenuada	Oral	“Rearranjo de genomas”

Várias iniciativas para disseminação de vacinas a populações menos favorecidas surgem e podem ser acompanhadas no site da Organização Mundial da Saúde (WHO), e de organizações como a PATH (<http://www.path.org>).

No Brasil temos um programa público de vacinação bem organizado, com calendários para atender a população por faixas etárias (crianças, adolescentes, adultos e idosos), além de um calendário especial para populações indígenas, que podem ser consultados no portal da saúde (<http://portal.saude.gov.br>).

À semelhança do sucesso na erradicação da varíola na década de 1970, foram estabelecidos novos objetivos. Assim, levando-se em conta a eficácia das vacinas contra o Sarampo e a Poliomielite e as características dessas doenças, a Organização Mundial da Saúde havia proposto como meta a erradicação desses vírus até o ano 2000. Esse objetivo não foi atingido, sendo que tivemos aqui em São Paulo uma forte epidemia de Sarampo nesse mesmo ano, e outros surtos mais recentes no país incluindo o deste ano (2019), contrariando as expectativas otimistas. Assim é necessário um maior investimento não só no aperfeiçoamento das vacinas já utilizadas, testes clínicos das recém desenvolvidas, bem como no desenvolvimento de novas vacinas para vírus como o HIV e o vírus da dengue.

- Manipulando os vírus para obter novas vacinas

Métodos clássicos

Atenuação

- Procura-se isolar novas cepas com menor potencial patogênico.
- Induzir mutações em laboratório e selecionar mutantes.
- Quando o genoma viral inteiro está clonado e manipulável, pode ser feita uma atenuação “não clássica” pela inserção planejada de mutações.

Inativação

- Pode ser obtida por tratamento com agentes químicos (Ex.: formalina), físicos (Ex.: irradiação) ou mistos (Ex.: inativação por foto-adutos como psoralenos).
- Ou fracionamento, obtendo proteínas purificadas a partir de uma cultura do vírus.

Novos Métodos

Vacinas baseadas em proteínas recombinantes

A estratégia consiste em clonar genes de proteínas virais em sistemas de expressão para obter essas proteínas em grande quantidade. Os sistemas de bactérias, leveduras e baculovírus são os mais utilizados.

Há uma grande quantidade em teste, e os exemplos das vacinas contra hepatite B e papilomavírus em uso, mencionados anteriormente. Essas proteínas purificadas, além de serem administradas isoladamente, também podem ser incorporadas em diferentes formulações vacinais.

Vacinas baseadas em peptídeos sintéticos

Peptídeos que contêm epítomos de células B ou T são capazes de induzir resposta humoral ou celular. Esses peptídeos podem ser obtidos por síntese química em grandes quantidades. Em geral, devido à baixa imunogenicidade, devem ser conjugados a moléculas maiores, com propriedades adjuvantes (estimulam a resposta imunológica).

Vacinas de DNA

Consistem em clonar genes de proteínas virais em plasmídeos bacterianos sob o controle de cassetes de expressão eucarióticos (entre um promotor e um sinal de poli-adenilação). Esses plasmídeos amplificados em bactérias e purificados podem ser então administrados. Os métodos de administração desse DNA podem ser físicos, como a injeção de uma solução, ou o “Gene gun” (canhão de genes, Fig 10) em que o DNA é disparado por pressão contra as células ou tecido, adsorvido a partículas de um metal neutro (ex.: ouro). Após incorporação pelas células do tecido inoculado esse antígeno é expresso e apresentado ao sistema imune.

Também podem ser métodos químicos que têm como princípio a neutralização das cargas do DNA para que a célula o incorpore através da membrana citoplasmática. Isso pode ser obtido por co-precipitação com fosfato de cálcio, formação de complexos com polímeros como DEAE-dextran e polilisina, ou através da complexação com lipídeos catiônicos formando lipossomos.



Fig 10.

As vacinas de DNA têm sido extensivamente testadas em modelos animais com resultados promissores para uso humano, havendo também testes clínicos em andamento em humanos. São capazes de induzir resposta humoral, mas são mais eficientes na indução de resposta de celular. Regimes mistos de imunização DNA-proteína frequentemente levam a efeitos sinérgicos de proteção contra desafio pelo vírus em questão.

Exemplos de vírus alvos de estudos com vacinas de DNA são HIV, papiloma, influenza, entre outros. Para uso veterinário já há vacinas de DNA aprovadas (Ex.: vírus West Nile).

Manipulando os vírus para obter vetores vacinais

Alguns vírus como vaccínia e outros pox vírus, adenovírus humanos e animais, e vírus adeno-associados, têm sido manipulados para utilização como vetores vacinais, e testes clínicos demonstram que são seguros. A estratégia é clonar genes de proteínas dos vírus patogênicos (antígenos selecionados) nos genomas desses vírus. Após infecção das células do tecido alvo escolhido, esse antígeno é expresso e apresentado ao sistema imune. Muitos vetores vacinais foram desenvolvidos, e estão sendo testados, para o HIV entre outros.

Imunogenicidade e adjuvantes

Nem sempre um antígeno ou microrganismo, que se pretende utilizar como vacina é imunogênico (provoca resposta imune). Nesse caso, é necessário elaborar uma formulação vacinal cuja imunogenicidade pode ser aumentada pela associação de um adjuvante (estimulante da resposta imunológica). Depois de comprovada a imunogenicidade e segurança da formulação vacinal em modelos animais são feitos testes em humanos.

Os adjuvantes mais comuns em vacinas utilizadas em humanos são os sais de alumínio (hidróxido e fosfato). O desenvolvimento de novos adjuvantes, mais potentes e seguros, é uma área importante em vacinologia. Podemos exemplificar com testes em andamento: saponinas, proteínas bacterianas e formulações de lipossomos.