

PATRÍCIA VANESSA DA SILVA NUNES

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS VACINAS ANTI-
VIRAIS: DA BANCADA ATÉ AOS PLANOS DE
VACINAÇÃO**

Orientador: Professor Doutor Nuno Ricardo de Almeida Saraiva

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde**

**Lisboa
2020**

PATRÍCIA VANESSA DA SILVA NUNES

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS VACINAS ANTI-
VIRAIS: DA BANCADA ATÉ AOS PLANOS DE
VACINAÇÃO**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, no Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. No dia 11 de dezembro de 2020, perante o júri nomeado pelo despacho N.º 266/2020 de 10 de novembro de 2020 com a seguinte composição.

Presidente: Prof.º Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente: Prof.º Doutor João Guilherme Costa

Orientador: Professor Doutor Nuno Ricardo de Almeida Saraiva

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2020

Agradecimentos

Em primeiro lugar tenho que agradecer às pessoas que tornaram todo o meu percurso académico possível, os meus queridos pais e os meus queridos avós. Obrigada pela força, pelo carinho constante, sem vocês não teria sido possível. Fico eternamente agradecida.

Ao meu companheiro de longa data, que me apoiou nas longas noites de estudo sempre a meu lado. Pedro obrigada por tudo.

À minha restante família, que sempre acreditou em mim e ficou feliz por terminar mais uma etapa na minha vida.

Aos meus colegas de faculdade, toda a ansiedade, *stress* e noites mal dormidas compensaram! Sem vocês o percurso não teria sido o mesmo! Ficam para sempre no meu coração.

Por fim não posso deixar de agradecer ao meu orientador, o Professor Dr. Nuno Ricardo de Almeida Saraiva, pela paciência, dedicação e ajuda neste percurso.

RESUMO

Os vírus são agentes infecciosos e parasitas obrigatórios. Na china, foi desenvolvida a prática da variação como forma preventiva da varíola, prática que foi levada para a Europa e que mostrou ser eficaz, reduzindo a taxa de mortalidade por varíola. Esta técnica foi importante para o desenvolvimento de outras vacinas.

Em Portugal, o Plano Nacional de Vacinação fez recentemente 54 anos de existência e tem tido excelentes resultados, com uma doença erradicada, cinco doenças eliminadas e sete doenças controladas.

Existe atualmente a necessidade de criar novas vacinas que induzam uma resposta imunitária adequada. O objetivo principal é sempre criar novas vacinas mais eficazes e seguras. Para isso várias estratégias de vacinação têm vindo a ser continuamente desenvolvidas.

Através do estudo feito foi possível verificar que ainda existem muitos países sem algumas vacinas anti-virais no seu Plano de Vacinação. Por outro lado, há ainda alguns países a introduzirem a vacina contra a Hepatite B. Entre o ano 2000 e 2009 foi introduzida em 93 países, mas ainda se verifica a introdução da mesma no ano 2019 em três países.

A nível global a adesão à vacinação tem vindo a aumentar. É exemplo disso o a vacina do HPV, estima-se que 47 milhões de mulheres de todo o mundo foram vacinadas. Existem vacinas que não têm tanta adesão, como a vacina do Rotavírus, em que as taxas de imunização são muito baixas.

Nos últimos 5 anos têm-se desenvolvido novas vacinas anti-virais, muitas delas contra o vírus do Ébola, pois há um número acrescido de mortes por essa doença nos últimos anos. O candidato mais próximo é o rVSV-ZEBOV, mas estão em ensaios clínicos outras vacinas promissoras. Em ensaios clínicos de fase I a fase III temos também vacinas para o vírus do Dengue, HBV e Poliovírus.

A ambição é chegar a 2030 evitando 167 milhões de novos casos de doenças, salvar 1,9 milhões de vidas e economizar 58 mil milhões de USD, mas para isso temos que definir novos desafios e objetivos.

Palavras-Chave: Vírus, Plano de Vacinação, Vacina, Eficácia, Ensaios Clínicos

ABSTRACT

Viruses are infectious agents and obligatory parasites. In China, the practice of variolation was developed as a preventive form of smallpox, a practice that was brought to Europe and which has proved to be effective in reducing the rate of mortality from smallpox. This technique was important for the discovery of other vaccines.

In Portugal, the National Vaccination Plan has recently made 54 years of existence and has had excellent results, with an eradicated disease, five eliminated diseases and seven controlled diseases.

There is a need to create new vaccines that induce an adequate immune response. The main objective is always to create new, more effective and safer vaccines. For this, several vaccination strategies have been continuously developed.

Through the study it was possible to verify that there are still many countries without having anti-viral vaccines in their Vaccination Plan. On the other hand, few countries are introducing the Hepatitis B vaccine. Between 2000 and 2009 it was introduced in 93 countries, but still there is an introduction in 2019 in three countries.

Globally, vaccination has been increasing its adherence, as in the case of the HPV vaccine, an estimated 47 million women worldwide were vaccinated. There are vaccines that do not have as much adherence, such as the Rotavirus vaccine, where immunization rates are very low.

In the last 5 years, new anti-viral vaccines have been developed, many of them against Ebola, as there are an increased number of deaths from this disease in recent years. The closest candidate is rVSV-ZEBOV, but other promising vaccines are in clinical trials. In phase I to phase III clinical trials, we also have vaccines for the Dengue virus, HBV and Poliovirus.

The ambition is to reach 2030 avoiding 167 million new cases of disease, saving 1.9 million lives and saving 58 billion USD, but for that we have to define new challenges and objectives.

Keywords: Viruses, Vaccination Plan, Vaccine, Efficacy, Clinical Trials

Lista de Abreviaturas

AFI - Alquilante Fotoinducível Iodonaftilazida

ccc-DNA – DNA circular covalentemente fechado

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CIN – Neoplasia Cervical Intraepitelial

DALY - *Disability Adjusted Life Years*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dsDNA – DNA de cadeia dupla

dsRNA – RNA de cadeia dupla

EPI - *Expanded Programme of Immunization*

FDA - *Food and Drug Administration*

GHSS - *Global Health Sector Strategy*

GP- Glicoproteína

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HPIV3 – Vírus da Parainfluenza Humano tipo 3

HPV – Vírus do Papiloma Humano

HR-HPV – Vírus do papiloma humano de alto risco

HSPGs – Proteoglicanos de sulfato de heparina

ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses*

IP – Imediatamente Precoce

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

mRNA – RNA Mensageiro

NHP – Primata Não Humano

NK – Natural-Killer

nm – Nanómetro

NPC – Proteína Transportadora do Colesterol de Niemann-Pick

Nsp – Proteínas de transporte nuclear

Nsps – Proteínas não estruturais

ORF – Fase de leitura aberta

P- Precoce

PAMP - Padrões Moleculares Associados a Patogénios

pgRNA- RNA pré-genómico

PNV – Plano Nacional de Vacinação

PRR - Padrões Codificados Por Linha Germinativa

PVX – Vírus da Batata X

rc-DNA – DNA circular relaxado

RCV – Vacina tripla contra o Sarampo, Rubéola e Papeira

RdRp – Conjunto RNA polimerase dependente de RNA

RE – Retículo endoplasmático

RNA – Ácido Ribonucleico

RTC – Complexo replicase-transcripase

rVEV – Vírus da Estomatite Vesicular Recombinante

SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida

ssDNA – DNA de Cadeia Simples

ssRNA – RNA de Cadeia Simples

T- Tardio

TLR – Recetores *Toll-like*

TMPRSS2 - serina protease transmembranar do tipo II

TMV – Vírus do Mosaico do Tabaco

TR – Transcriptase Reversa

UFP – Unidade Formadora de Placas

VAERS - *Vaccine Adverse Event Reporting System*

VAS – Vacina Contra o Sarampo

VASPR - Vacina Combinada Contra o Sarampo, Parotidite Epidémica e Rubéola

VEV – Vírus da Estomatite Vesicular

VLP – Partícula Semelhante a Vírus

VP – Proteína Viral

VSD - *Safety Datalink Vaccine*

WHO – *World Health Organization*

ÍNDICE

1. 1. INTRODUÇÃO	1
1.1 História da Virologia.....	1
1.2. Vírus	3
1.2.1. Partícula viral	5
1.2.2. Classes de vírus	7
1.2.3. Ciclo replicativo.....	10
1.2.4. Exemplos de vírus causadores de doenças em humanos.....	11
1.3. Vacinas.....	29
1.3.1. História da vacina	29
1.3.2. Tipos de Vacinas	34
1.3.3. Estratégias de produção de vacinas	37
1.3.4. Vias de imunização	38
1.3.5. Comparação da eficácia/segurança e custo/benefício entre vacinas	39
2. 2. METODOLOGIA	42
3. 3. VACINAS ANTIVIRAIS QUE ENTRARAM NO PLANO DE SAÚDE, A NÍVEL MUNDIAL	44
4. 4. VACINAS ANTIVIRAIS EM DESENVOLVIMENTO E EM ENSAIOS CLÍNICOS NOS ÚLTIMOS 5 ANOS	55
5. 5. DISCUSSÃO/CONCLUSÃO	63
6. 6. PERSPETIVAS FUTURAS	66
7. 7. BIBLIOGRAFIA	68

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura do vírus do mosaico do tabaco.	3
Figura 2 – Estrutura da partícula viral	6
Figura 3 – Tipos de estrutura da partícula viral	7
Figura 4 – Classificação de Baltimore.....	9
Figura 5 – Diagrama de uma célula mostrando as possíveis vias que diversos vírus podem usar durante o seu ciclo de replicação.	10
Figura 6 – Vírus do Papiloma Humano	12
Figura 7 – Entrada do HPV.....	13
Figura 8 – Estrutura do vírus Ébola.....	14
Figura 9 – Ciclo de replicação do vírus Ébola.	15
Figura 10 – Estrutura do vírus do sarampo.	16
Figura 11 – Ciclo de replicação do sarampo.	17
Figura 12 – Estrutura dos Rotavírus.	18
Figura 13 - Ciclo de replicação do Rotavírus.	19
Figura 14 – Estrutura do vírus HIV-1 e HIV-2.....	20
Figura 15 – Ciclo de replicação do HIV.....	21
Figura 16 – Fases da infecção por HIV ao longo dos anos.....	22
Figura 17 - Estrutura do vírus da Hepatite B.	23
Figura 18 – Ciclo de replicação do vírus da Hepatite B.....	23
Figura 19 – Estrutura do vírus da Hepatite C.	24
Figura 20 – Ciclo de replicação do vírus da Hepatite C.....	25
Figura 21 – Estrutura do vírus Influenza.	26
Figura 22 – Ciclo replicativo do vírus da Influenza.	27
Figura 23 – Estrutura do SARS-CoV-2.....	28
Figura 24 – Ciclo replicativo do SARS-CoV-2.	29
Figura 25 – Data de algumas campanhas de vacinação de 1973 a 2011 em Portugal.	32
Figura 26 – Características essenciais da vacinação.....	33
Figura 27 – Fatores chave considerados no projeto, formulação e inoculação de vacinas de DNA para melhorar a eficiência da transfeção in vivo e a imunogenicidade do antígeno	35
Figura 28 – Exemplo do modo de pesquisa na base de dados no site WHO	42
Figura 29 – Formato em que os dados dos países que introduziram vacinas anti-virais são apresentados na base de dados da WHO	43

Figura 30 – Número de países que introduziram algumas vacinas anti-virais de 2000 a 2019 de acordo com a base de dados da WHO.....	45
Figura 31 – Número total de países que introduziram algumas vacinas anti-virais entre 2000 e 2019 de acordo com a base de dados da WHO	45
Figura 32 – Percentagem de crianças vacinas contra o Rotavírus entre 2014 e 2020 globalmente - Vanderslott et al., (2019).....	47
Figura 33 – Áreas de risco de transmissão do vírus da encefalite japonesa e introdução de vacina.....	49
Figura 34 – Número de mulheres vacinadas contra HPV de 2006 até 2014, cumprindo todas as doses da vacina globalmente - Bruni et al.,(2016).	51
Figura 35 – Países que introduziram no programa nacional de vacinação a vacina contra o HPV desde 2006, por ano.	52
Figura 36 – Número de mortes evitadas (milhões) entre o ano 2011 e 2020 num cenário de não vacinação, após a vacinação das vacinas anti-virais contra o Sarampo (1ª e 2ª dose), Hepatite B, Rotavírus, Papiloma Humano, Febre-amarela e uma campanha de vacinação em África contra Sarampo com a 1ª e 2ª dose da vacina contra o Sarampo.	54
Figura 37 – Tipo de vacinas em desenvolvimento contra SARS-CoV-2 e a sua quantidade.	61
Figura 38 – Vidas salvas, casos evitados e benefícios económicos previstos até ao ano 2030.....	66

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Alguns marcos da área de estudo de vírus causadores de doenças em humanos.....	5
Tabela 2 – Resumo da evolução da vacinação do PNV em Portugal – Introdução e retirada de vacinas entre 1965 e 2020	31
Tabela 3 – Vacinas produzidas em meio de cultura biológica derivado de embriões de galinha.	37
Tabela 4 – Estudos clínicos sobre a eficácia da vacina contra HPV	41
Tabela 5 - Número de Estados-Membros de baixa e médio rendimento que introduziram uma vacina nova e subutilizada entre janeiro de 2010 e dezembro de 2015 e mantiveram seu uso por pelo menos 12 meses, por elegibilidade da vacina e GAVI.....	53
Tabela 6 – Desenvolvimento de algumas vacinas intradérmicas.	60

1. INTRODUÇÃO

A ciência da virologia é relativamente recente. É possível em alguns casos reconhecer vírus específicos como agentes causadores de epidemias que ocorreram há centenas ou milhares de anos apenas pelas descrições escritas da doença ou do estudo de múmias com anormalidades características (Strauss, James H., 2008).

Há pouco mais de 100 anos descobriu-se que os vírus eram agentes filtráveis e portanto, distintos das bactérias que causam doenças infecciosas. Há cerca de 60 anos a composição dos vírus foi descrita (Strauss, James H., 2008).

Uma das dez maiores conquistas em saúde pública do século passado foi a vacinação preventiva. As vacinas reduziram substancialmente a propagação de doenças e mitigaram a mortalidade associada a agentes infecciosos como difteria, tétano, poliomielite, sarampo, papeira, rubéola e hepatite B (Criscuolo et al., 2019). A imunização é e deve ser reconhecida como um componente central do direito humano à saúde e uma responsabilidade individual, comunitária e governamental. A vacinação previne cerca de 2,5 milhões de mortes a cada ano (Asselin et al., 2013).

Para serem eficazes, as vacinas devem induzir imunidade protetora sem que provoquem patogenicidade (Nascimento & Leite, 2012). Atualmente a qualidade e a eficácia das vacinas depende da estabilidade do antígeno e também da sua capacidade de induzir uma resposta imunitária. Num cenário ideal as vacinas devem ser capazes de induzir todos os tipos de respostas imunitárias e serem eficazes em todos os indivíduos, deverão apresentar um baixo custo e rapidez de produção, para poderem ser acessíveis em todo o mundo e por toda a gente (Singh, Pandey, & Mittal, 2010).

A via de administração da vacina pode ter influência no custo, eficácia e adesão à mesma, ou seja, deve ser eficiente, não pode comprometer a estabilidade do produto durante o armazenamento, durante o transporte e não pode influenciar negativamente a percepção do paciente. As vacinas atualmente licenciadas são veiculadas por uma das cinco principais vias de administração: intramuscular, que é usada para a maioria das vacinas, subcutânea para vacinas como a do sarampo, intradérmica, intranasal como algumas vacinas contra a influenza e oral para a poliomielite (Lambert & Laurent, 2008).

1.1 História da Virologia

Os primeiros registos de doenças causadas por vírus foram feitos pelas civilizações greco-romanas e egípcias (N. S. D. O. Santos, Romanos, & Wigg, 2015). O primeiro registo escrito de uma infeção viral está num hieróglifo de Memphis, capital do Egito antigo, aproximadamente em 3700 AEC. No hieróglifo vê-se um sacerdote do

templo que mostra sinais de poliomielite paralítica. Para além deste registo, acredita-se que o faraó Ramsés V, em 1196 aC, cujo corpo está num museu do Cairo, bem preservado, tenha morrido de varíola, pois consegue-se notar na face da múmia umas lesões pustulosas que são idênticas às lesões de pacientes recentes, o que é algo surpreendente (Cann, 2012).

Em 1840, Jacob Henle, um médico alemão, sugeriu a possível existência de agentes infecciosos, com a capacidade de provocar doenças, mas que seriam muito pequenos para se conseguir ver ao microscópio ótico. Como não tinha evidências que comprovassem a sua teoria, as suas ideias não foram aceites (Gomes, 2003). No entanto várias descobertas importantes levaram à aceitação da teoria de “germes causadores de doenças”. A primeira ocorreu em 1867, por Louis Pasteur, que estudou o fenómeno da fermentação e demonstrou que diferentes tipos de microrganismos estavam associados a diferentes tipos de processos, tais como a produção de álcool, ácido láctico e ácido acético. Esta ideia foi importante e fundamental para a construção de teorias sobre o desenvolvimento das doenças (Cann, 2012). A segunda foi protagonizada pelo cirurgião inglês Joseph Lister, um admirador do trabalho de Pasteur, que afirmou que as infeções de ferida aberta eram causadas por microrganismos presentes no ambiente. Introduziu técnicas assépticas, tendo realizado a primeira cirurgia nesse contexto e conseguiu provar e demonstrar a importância da antissepsia para reduzir as infeções durante cirurgias (Cann, 2012). Em 1876, Robert Koch, que foi um dos fundadores da microbiologia, descobriu a bactéria responsável pelo antraz e descreveu a transmissão da doença, em que a doença podia ser transmitida pelo sangue de animais infetados pelo bacilo (Lakhtakia, 2014).

O médico e biólogo americano Joshua Lederberg, premiado com o prémio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1958 disse:

“Os únicos reais competidores da humanidade pelo domínio do planeta são os vírus, os quais podem servir como parasitas e elementos genéticos nos seus hospedeiros. Os vírus não só apresentam uma plasticidade genética que os capacita a evoluir em novas direções, como também mostram a capacidade de interação genética e metabólica com as células infetadas, que os coloca em posição de mediar alterações evolucionárias cumulativas nas células hospedeiras. Contudo, o efeito das infeções virais não é sempre subtil; os vírus podem também dizimar uma população.” (N. S. D. O. Santos et al., 2015).

No início da década de 1920, iniciaram-se as pesquisas com enzima e métodos para a sua purificação. Por volta do ano 1927 e 1931 começou a haver uma maior noção acerca dos agentes filtráveis eram constituídos por proteínas. Em 1929 cientistas do *Boyce Thompson Institute for Plant Research* em Nova Iorque, aplicaram o processo de separação de proteínas ao sumo das folhas do tabaco que apresentavam ter a doença do mosaico, e após tratamento prévio com etanol, acetona e sais, as partículas

precipitadas migravam em gel electroforese submetido a um campo magnético, idêntico ao que acontece a uma proteína. Deste modo, provou-se a existência de proteínas nos agentes filtráveis (Acheson, 2011). Em 1935, Wendell Meredith Standley, bioquímico, purificou o vírus do mosaico do tabaco (TMV), o que resultou numa preparação infecciosa formada por cristais, cuja análise química mostrou a existência de proteínas. Um ano depois, Frederick Bawden e Norman Pirie, em Londres, demonstraram que os cristais do vírus do mosaico do tabaco também continha fósforo e ácido ribonucleico (RNA), e em 1939, G. A. Kauche, E. Pfankuch e H. Ruska obtiveram a primeira micrografia eletrónica de um vírus – TMV (figura 1) (N. S. D. O. Santos et al., 2015).

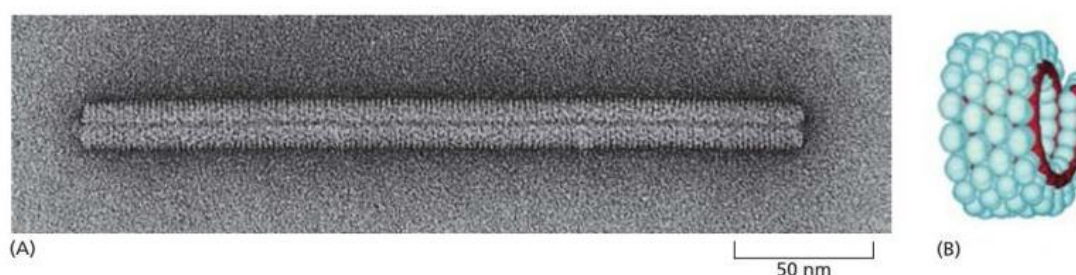


Figura 1 – Estrutura do vírus do mosaico do tabaco.

(A) Micrografia eletrónica de uma partícula viral, composta por uma única molécula longa de RNA, envolvida por um invólucro proteico cilíndrico formado por subunidades proteicas idênticas. (B) Modelo de parte da estrutura do TMV. Uma molécula de RNA de cadeia simples de 6.395 nucleótidos é empacotada num invólucro helicoidal de 2.130 cópias de uma proteína de invólucro com 158 aminoácidos. As partículas infecciosas de um vírus podem se auto-organizar num tubo de ensaio a partir do RNA e das moléculas proteicas purificadas. Fonte: Alberts, B., et al, *Biologia Molecular da Célula*, (2017).

1.2. Vírus

Os humanos começaram a entender a natureza dos vírus apenas no final do século XIX, embora os vírus estiveram provavelmente presentes entre as primeiras estruturas biológicas e tenham evoluído ao longo de vários milhares de milhões de anos (Acheson, 2011).

Ainda não há certezas da origem dos vírus, mas existem algumas teorias. Existe a hipótese regressiva, ou de redução, que tem como teoria que o vírus surgiu como pequenas células que infectam células maiores. Estas células pré virais perdem as duas características metabólicas e quase toda a sua habilidade reprodutora, tornando-se inertes fora de um ambiente celular, dependente das vias celulares para se reproduzirem (Korsman, Zyl, Nutt, Andersson, & Preiser, 2012). A hipótese da origem celular ou progressiva, sugere que elementos móveis, como retrotransposões, que são

elementos constituídos de sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA) que se movem através de transcrição reversa, foram capazes de sair do seu ambiente celular original e moveram-se para outras células onde foram capazes de se replicar e por último a hipótese de coevolução que defende que as células e os vírus se desenvolveram ao mesmo tempo (Korsman et al., 2012).

No século XIX considerava-se que muitas doenças eram provocadas por elementos misteriosos, chamado de vírus, que significa “veneno” em latim, mas a distinção do que é hoje chamado de vírus e microorganismos celulares não era clara. Os cientistas utilizaram microscópios óticos para descobrir e descrever fungos e bactérias no século XIX. Louis Pauster e Robert Koch isolaram e cultivaram várias bactérias no final do século, algumas delas responsáveis por doenças que causaram muitas mortes, como por exemplo a tuberculose. Apesar de mais tarde terem descoberto e desenvolvido vacinas eficazes contra a varíola e a raiva, ainda não havia um entendimento acerca das doenças, que agora sabemos que são provocadas por vírus (Acheson, 2011).

Na tabela 1 podemos verificar algumas das mais importantes descobertas da área de estudo de vírus causadores de doenças em humanos e das respectivas vacinas que vêm sendo desenvolvidas.

Tabela 1 – Alguns marcos da área de estudo de vírus causadores de doenças em humanos - adaptada de Acheson, Nicolas H., *Fundamentals of Molecular Virology*, 2011; Lai, A. Et al., *History of Virology*, 2014

Descoberta	Data	Cientistas	Prémio Nobel
Vacina da Varíola	1798	Edward Jenner	
Vacina da Raiva	1885	Louis Paster	
Vírus do mosaico do Tabaco	1892	Dimitrii Ivanovski	
	1898	Martinus Beijerinck	
Febre aftosa (bovinos)	1898	Friedrich Loeffler e Paul Frosch	
Febre-amarela (em humanos e transmitida por mosquitos)	1900	Carlos Finlay e Walter Reed	
Vacina contra febre-amarela	1930's	Max Theiler	1951
Crescimento do poliovírus em cultura de células	1949	John Enders Frederick Robbins e Thomas Weller	1954
Descoberta do interferão	1957	Alick Isaacs e Jean Lindenmann	
Vacinas Poliovírus			
Morta	1955	Jonas Salk	
Viva	1960	Albert Sabin	
Descoberta do vírus da Hepatite B	1969	Baruch Blumberg	1976
Transcriptase reversa em retrovírus	1971	Hoeard Temin e David Baltimore	
Vetores de vírus e engenharia genética	1970's	Paul Berg	1980
Descoberta do vírus Hepatite A	1973	Stephen Feinstone	
Oncogene celular faz parte de um genoma de retrovírus	1976	Michael Bishop e Harold Varmus	1989
"Splicing" RNA num adenovírus	1977	Phillip Sharp and Richard Roberts	1993
Papilomavírus humano causa cancro cervical	1972-	Harald zur Hausen	2008
	1984		
Descoberta do vírus HIV (HIV-1)	1983	Luc Montagnier e Françoise Barré-Sinoussi	2008
Descoberta do vírus da Hepatite C	1989	Qui-Lim-Cho, George Kuo, Daniel Bradley, Michael Houghton	
Descoberta do Herpes-vírus Humano 8 (HHV-8)	1994		
Descoberta do coronavírus-SARS	2003	Carlo Urbani, Malik Peiris, Stefano Lai, Albert Osterhaus	
Aprovada a vacina contra Rotavírus	2006	Standley Plotkin, Ian Clark, Paul Offit	
Descoberta do coronavírus-SARS 2	2019		

1.2.1. Partícula viral

Os vírus são agentes infecciosos parasitas intracelulares obrigatórios. Para se replicarem têm que infetar e assumir o controlo de uma célula hospedeira. À partícula do vírus extracelular dá-se o nome de virião ou partícula viral. Este contém um genoma de DNA ou RNA, que está envolvido numa camada de proteína chamada de cápside ou nucleocápside. Os vírus que têm ao redor da nucleocápside um envelope lipídico,

dizem-se “envelopados”. A função da cápside ou do envelope é proteger o genoma viral e promover a entrada do genoma numa nova célula suscetível (Strauss, James H., 2008). Alguns vírus carregam e codificam as suas próprias enzimas, necessárias para a replicação do seu genoma (Korsman et al., 2012). Podemos ver algumas características da partícula viral (figura 2).

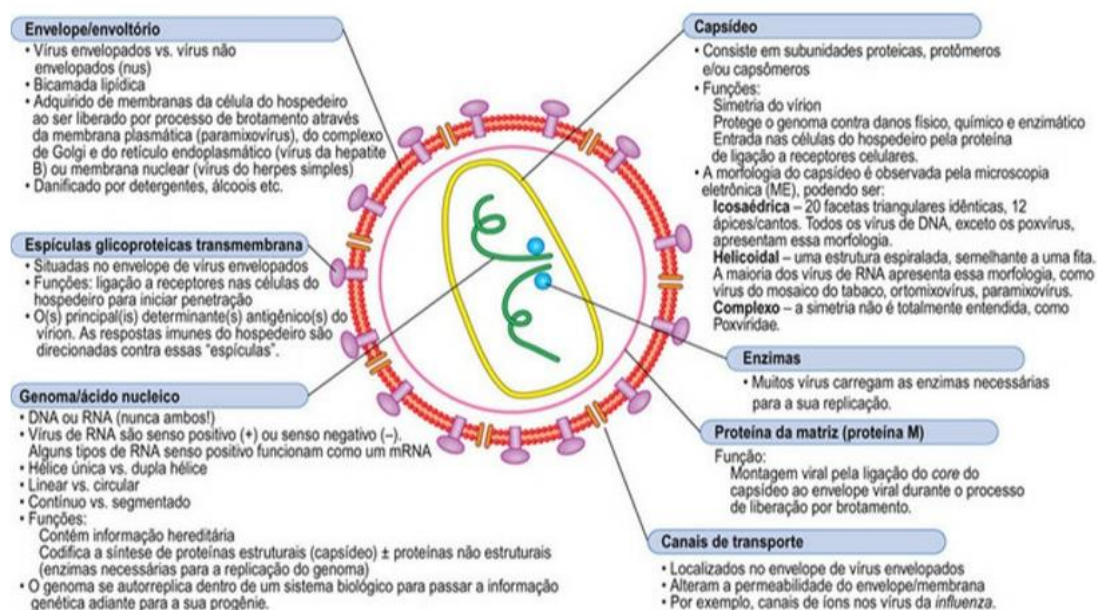


Figura 2 – Estrutura da partícula viral – Fonte: Korsman et al., (2012).

O genoma de um vírus contém todas as informações necessárias para que o vírus se consiga replicar e produzir novos viriões após se introduzir numa nova célula. Os viriões ligam-se aos receptores presentes na superfície da célula, e por processos específicos que irão ser explicados mais à frente, o genoma é libertado no citoplasma da célula (Strauss, James H., 2008).

Os vírus podem variar de tamanho, entre 20 até 400 nm e também apresentam formatos diferentes (figura 3).

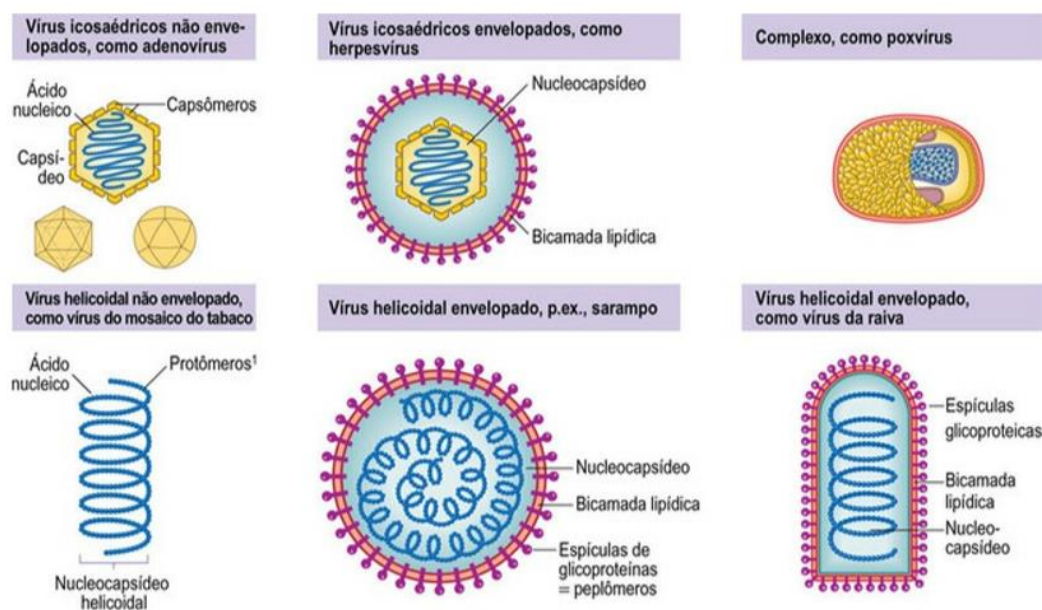


Figura 3 – Tipos de estrutura da partícula viral – Fonte: Korsman, S. N. J., Zyl, G. U. Van, Nutt, L., Andersson, M. I., & Preiser, W.. *Virology*, 2011.

1.2.2. Classes de vírus

Podemos reconhecer três grandes classes de vírus, que podem ter diferentes origens evolutivas e independentes:

- Uma das classes, que inclui o vírus do herpes e o poxvírus, têm DNA de cadeia simples ou dupla como genoma. que é replicado por cópia direta de DNA para DNA. Quando se dá a infecção, o DNA viral é transcrito pelas RNA polimerase celular e/ou viral, dependendo do vírus, para produzir RNA's mensageiros (mRNA's) para a tradução em proteínas virais. O genoma do DNA é replicado pelas polimerases de DNA que tanto podem ser de origem viral como celular. Enquanto que a maioria dos vírus de DNA faz a sua replicação do genoma no núcleo, os poxvírus replicam-se no citoplasma, como foi referido anteriormente.
- Existe depois uma segunda classe de vírus, que contém RNA como genoma e o RNA é replicado por cópia direta, RNA para RNA (Strauss, James H., 2008). Alguns vírus de RNA, como o vírus da febre-amarela, que pertence à família *Flaviviridae* e o poliovírus que pertence à família *Picornaviridae*, que possuem um genoma que é um RNA mensageiro, mRNA, definido como RNA de cadeia positiva. Os de RNA de cadeia negativa possuem o seu RNA principal complementar ao seu RNA mensageiro (por exemplo o vírus da ébola e da gripe) (Levinson, 2014). Alguns vírus de RNA, como por exemplo o rotavírus, que

pertence à família *Reoviridae*, que possuem genomas de RNA de cadeia dupla (Roberto & Stephens, 2010).

- A terceira classe de vírus codifica a enzima transcriptase reversa (TR) e esses vírus apresentam no seu ciclo de vida uma etapa RNA para DNA. A informação genética codificada por estes vírus vai alternando, entre estar presente no RNA ou estar presente no DNA. Os retrovírus contêm uma fase de RNA no virião, a sua replicação do genoma ocorre através de um intermediário de DNA (RNA → DNA → RNA). Os hednavírus contêm a fase do DNA no seu genoma, que é circular, e em grande parte é de cadeia dupla. Então o seu genoma replica-se através de um intermediário de RNA (DNA → RNA → DNA) (Strauss, James H., 2008).

O *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) está a tentar criar um sistema uniforme para a classificação e nomenclatura de todos os vírus. Eles agrupam os vírus de acordo as suas propriedades físico, química e biológicas, assim como as das células que infectam. Desta forma, os vírus podem ser classificados de acordo com o tipo de ácido nucleico, simetria da cápside, presença ou ausência do envelope, tamanho e sensibilidade a substâncias químicas. Quanto ao genoma pode ser constituído por cadeia simples ou dupla, linear ou circular, positiva ou negativa. O ICTV reconheceu 5450 vírus como espécies e classificou essas espécies em 287 géneros pertencentes a 73 famílias, além dos géneros "flutuantes" que ainda não foram atribuídos a nenhuma família (Roberto & Stephens, 2010).

Existe outro tipo de classificação, a classificação de Baltimore (figura 4). Uma vez que o genoma viral se encontra no compartimento certo da célula, ele vai direccionar a expressão de proteínas precoces que vão permitir a sua replicação. A natureza química e a cadeia do genoma vão influenciar as vias moleculares que levam à síntese de proteínas virais precoces a partir de mRNA's virais. David Baltimore reconheceu que todos os vírus podem ser divididos em seis grupos, com base nas vias que levam à síntese de mRNA e proteínas (Madigan, Jack, & John, 2004).

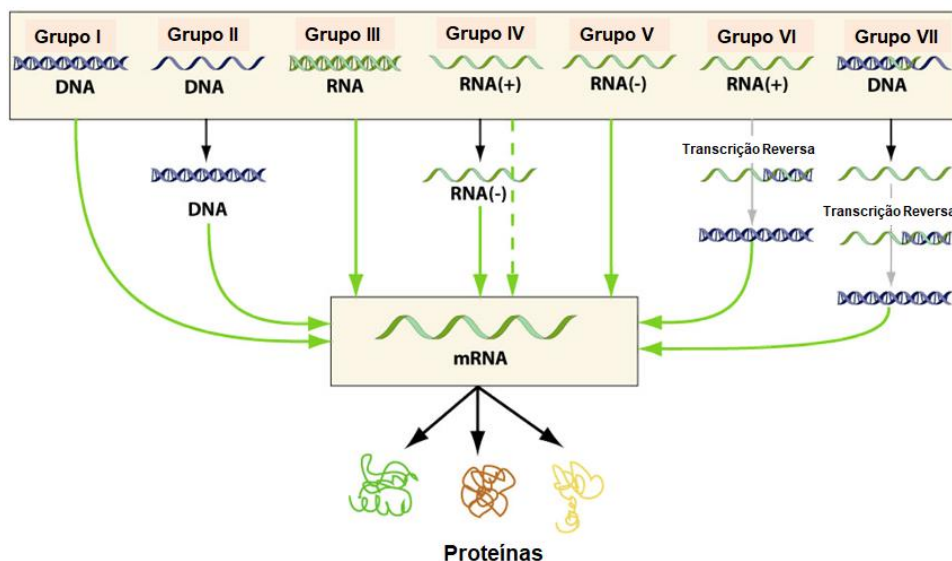


Figura 4 – Classificação de Baltimore. Imagem adaptada de: Chair, et al., “A RNA Virus Reference Database (RVRD) to Enhance Virus Detection in Metagenomic Data”, (2016).

Grupo 1: DNA de cadeia dupla (dsDNA) – que é diretamente transcrito em mRNA. Exemplo: Adenovírus, Herpesvírus, Poxvírus.

Grupo 2: DNA de cadeia simples (ssDNA) ou dupla, positivo ou negativo – replicação no núcleo, formação de cadeia complementar a transcrição do mRNA. Ambos utilizam um intermediário de dsDNA para sintetizar o mRNA. Exemplo: Parvovírus.

Grupo 3: RNA de cadeia dupla (dsRNA) – genomas por norma segmentados, e cada segmento é transcrito em mRNA. Exemplo: Reovírus

Grupo 4: RNA de cadeia simples (ssRNA) positiva. Exemplo: Picornavírus, Togavírus.

Grupo 5: RNA de cadeia simples negativa (ssRNA) – Nesta classe o RNA é o mRNA. O RNA é complementar ao mRNA, servindo para a síntese das várias moléculas de RNA (positivo) necessárias para controlar a célula hospedeira. Exemplo: Orthomyxovírus, Rhabdovírus.

Grupo 6: RNA de cadeia simples positiva (ssRNA) – tem como intermediário o dsDNA. A transcriptase reversa viral forma uma molécula de DNA que então sofre o processo de transcrição por ação das enzimas do hospedeiro. Exemplo: Retrovírus (Madigan et al., 2004).

Entretanto surgiu uma nova classe, Classe 7: Vírus de DNA de cadeia dupla com RNA intermediário. Exemplo: Hepadnavírus. Os hepadnavírus podem ser vistos como um caso especial, pois o seu genoma é feito de cadeia dupla por polimerase celular de DNA após a entrada na célula. Esse DNA de cadeia dupla é transcrito em mRNA's pela

RNA polimerase celular. Diferentemente de outros vírus, os hepadnavírus codificam uma transcriptase reversa. Essa transcriptase é usada para sintetizar o genoma de DNA de cadeia simples. Esse DNA é produzido por transcrição reversa de uma molécula de RNA, que é um dos produtos de transcrição do DNA de cadeia dupla (Aiewsakun & Simmonds, 2018).

1.2.3. Ciclo replicativo

Os genomas virais podem apresentar um tamanho extremamente reduzido, os vírus não apresentam organização celular, organelos ou ribossomos e não têm capacidade de produzir a sua própria energia, e por isso, ao contrário dos organismos celulares, os vírus não são considerados vida (Cann, 2012). Podemos verificar as vias genéricas de entrada do vírus na célula e as etapas de replicação (figura 5).

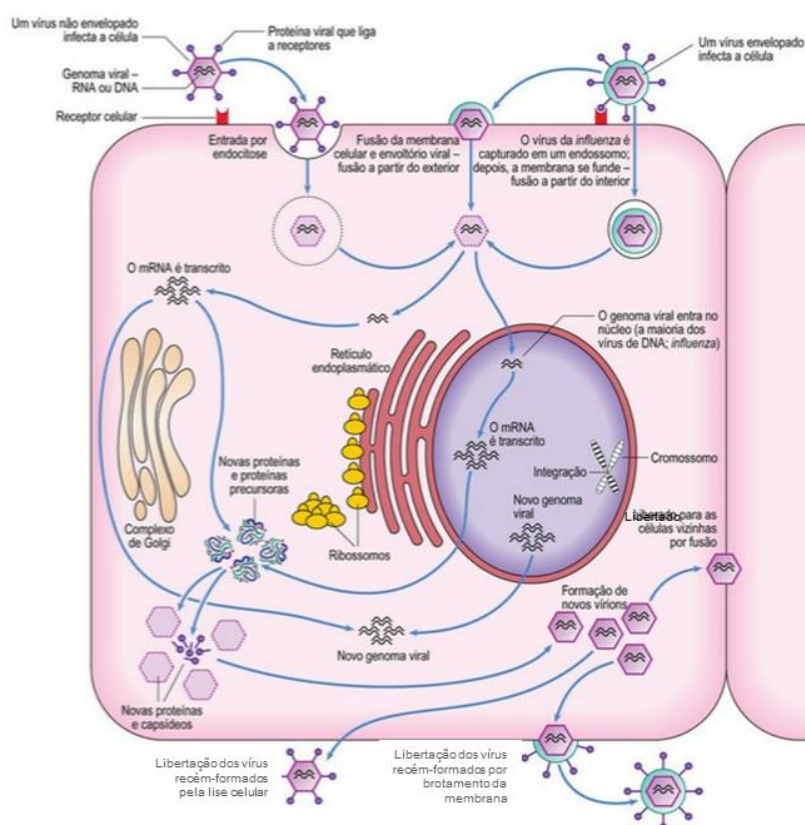


Figura 5 – Diagrama de uma célula mostrando as possíveis vias que diversos vírus podem usar durante o seu ciclo de replicação. Fonte: Korsman et al., (2012).

As etapas do ciclo de replicação viral são: a adsorção, que consiste na ligação aos recetores primários, e algumas vezes aos recetores secundários na célula; entrada ou penetração na célula pela fusão do invólucro com a membrana citoplasmática ou endocitose mediada por recetor entre outros; “*uncoating*” com libertação do genoma no citoplasma; transcrição de genoma em RNA ou DNA; transcrição do mRNA; tradução de proteínas não estruturais e estruturais; incorporação de novos genomas em novos viriões durante a montagem e por fim libertação da célula por brotamento ou gemiparidade, lise celular ou disseminação direta célula-célula (Korsman et al., 2012). Em alguns casos pode existir ainda um passo de maturação que pode ocorrer fora da célula, como é o caso dos retrovírus.

Porém, existem algumas etapas extras que dependem do tipo de vírus que infeta a célula, por exemplo, o adenovírus ou o vírus da influenza, que entram na célula por endocitose, devem ser libertados dos endossomas. Outros vírus, como por exemplo o enterovírus, codificam um genoma que pode ser usado diretamente como mRNA, e proteínas iniciais são traduzidas, permitindo os passos posteriores da replicação, e portanto não necessitam de incorporar a enzima polimerase no seu virião (Korsman et al., 2012). O herpes-vírus possui uma cascata complexa de genes imediatamente precoces (IP), precoces (P) e tardios (T) que são transcritos e traduzidos antes das etapas de replicação do genoma. Essas etapas podem ser acentuadas ou inibidas por vários produtos genéticos para otimizar a replicação. Os retrovírus incluem a integração no genoma do hospedeiro como parte do seu ciclo. Alguns vírus, a maioria dos vírus de DNA, precisam de ser replicados no núcleo, enquanto que a maioria dos vírus de RNA são replicados no citoplasma (Cann, 2012).

O processamento do mRNA pode ser simples ou pode ter estratégias complexas como o *splicing*. Após a infeção o ciclo de multiplicação viral entra numa fase de eclipse na qual a identidade física e a infetividade geralmente estão perdidas, quanto que a replicação está ativa a nível molecular intracelular. Nesta fase o paciente infetado está assintomático e não sabe que está infetado. Após esta replicação os vírus são libertados das células podendo infetar mais células ou infetar outros hospedeiros. Este período é conhecido como fase produtiva (Korsman et al., 2012).

1.2.4. Exemplos de vírus causadores de doenças em humanos

- Papilomavírus Humano (HPV)

O HPV é o agente causador de uma das infeções virais mais comuns do trato reprodutivo. É transmitido sexualmente ou por contato genital. Existem vários tipos de HPV mas muitos deles não causam nenhum problema de saúde grave. A manifestação mais comum nestes casos é o aparecimento de verrugas. Uma pequena parte das

infecções com este vírus podem levar ao desenvolvimento de cancro cervical (Das Graças et al., 2011).

A partícula viral tem cerca de 60 nanómetros (nm), tem uma forma icosaédrica e não tem envelope. A molécula de genoma de dsDNA circular está contida na cápside. O genoma tem cerca de 8 kb de tamanho e está associado a histonas celulares (figura 6) (“Alphapapillomavirus”, Viral Zone, Swiss Institute of Bioinformatics, 2010).

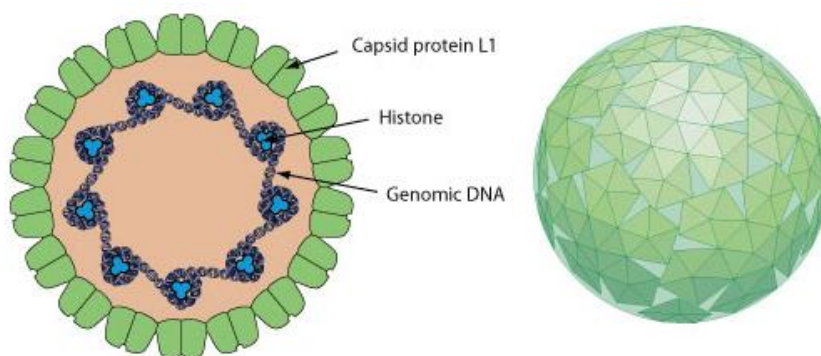


Figura 6 – Vírus do Papiloma Humano. Fonte: “Alphapapillomavirus”, Viral Zone, Swiss Institute of Bioinformatics (2010).

Os dois principais géneros são o Alfa e o Beta papilomavírus, e que cerca de 90% dos HPV's pertencem a um destes dois grupos. Existem cerca de 30 tipos de HPV's conhecidos por infetar o epitélio cervical. Dezanove deles foram classificados como de alto risco devido à sua associação com a carcinogénese cervical. Os 19 tipos são: 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82. O HPV 16 é o mais prevalente HPV de alto risco sendo responsável por aproximadamente 50% de todos os cancros cervicais (Burk, Chen, & Van Doorslaer, 2009).

A partícula viral consegue atingir a camada basal do epitélio por meio de microbrasões para infetar queratinócitos basis ou células epiteliais. No colo do útero, o vírus de alto risco (HR-HPVs) pode atingir diretamente a camada de células epiteliais cuboidais que é a região mais sensível à infeção (Gheit, 2019). O vírus liga-se às cadeias de proteoglicanos De sulfato heparan (HSPGs) que podem se localizar na matriz extracelular ou na membrana celular através da proteína principal da cápside L1 o que leva a alterações conformacionais mediadas pela ciclofilina (CyP) B, e expões a proteína L2 na superfície da partícula viral (figura 7). De seguida o terminal N da proteína é clivado o que facilita a ligação do HPV a um recetor secundário não identificado, permitindo a subsequente internalização que é dependente de actina. O complexo L2-

DNA viral e uma porção de L1 são entregues à rede trans-Golgi. Dentro dos endossomos tardios a cápside da partícula viral é “desmontada” num ambiente de pH baixo o que leva à dissociação da L1 com a L2. O complexo L2-DNA viral é assim entregue no núcleo para o domínio nuclear, durante a mitose celular (Graham, 2017).

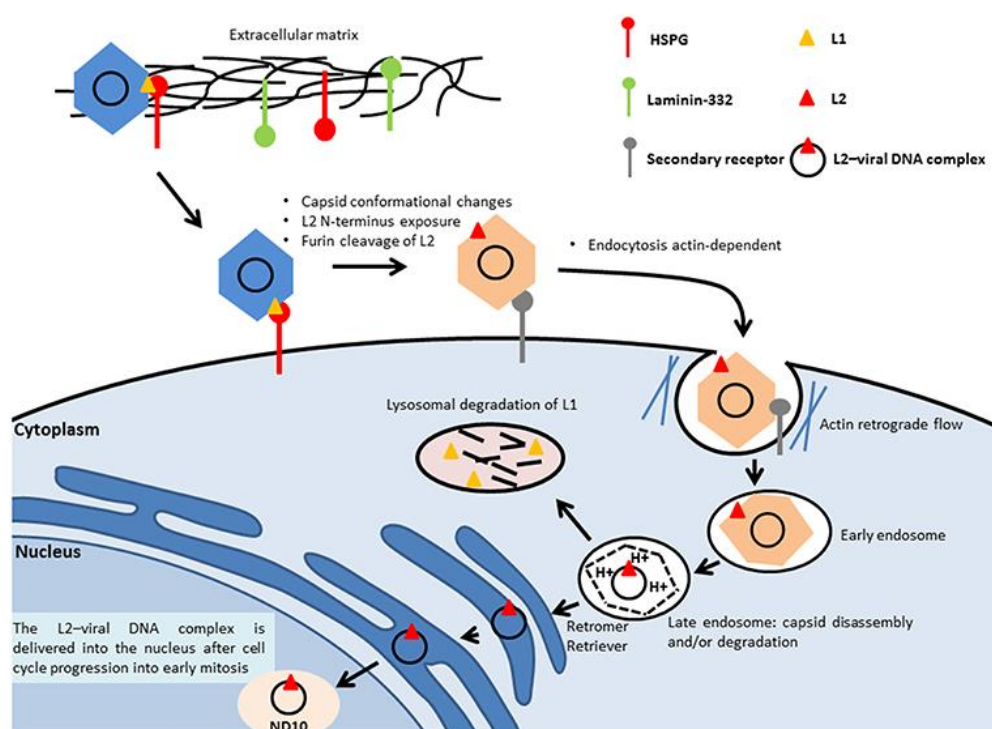


Figura 7 – Entrada do HPV. Fonte: Gheit, (2019).

Nas lesões malignas o DNA viral está integrado nos cromossomos da célula hospedeira e não ocorre replicação viral. Vai ocorrer uma inativação da expressão da proteína E2, que funciona como regulador negativo da expressão dos oncogenes E6 e E7, que têm como função promover a imortalização celular inibindo as proteínas celulares reguladoras do ciclo celular (p53 e pRB) que são essenciais para a supressão tumoral. Nas lesões benignas, a replicação do genoma é extracromossômica (Das Graças et al., 2011).

- Vírus do Ébola

O ébola é uma doença grave, muitas vezes fatal e com uma taxa de letalidade que pode chegar aos 90%. A sua transmissão pode ser por contato de fluidos corporais, sangue, superfícies contaminadas ou contato direto com indivíduos infectados. O vírus do ébola tem 80 nm de diâmetro. O seu genoma linear de RNA de cadeia negativa tem

um tamanho de 18 na 19 kb. Apresenta uma estrutura longa e filamentosa, essencialmente baciliforme, mas os vírus muitas vezes adquirem a forma de u, b ou mesmo formas circulares (figura 8) (Banadyga & Marzi, 2017).

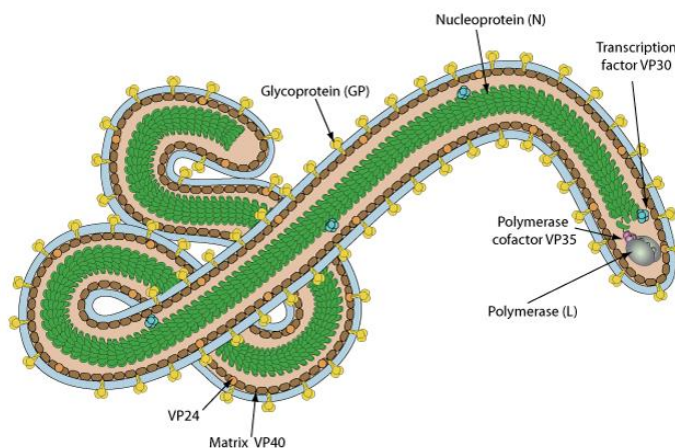


Figura 8 – Estrutura do vírus Ébola. Fonte: "Ebola virus", Viral Zone, Swiss Institute of Bioinformatics (2014).

A replicação inicia-se com a ligação aos recetores do hospedeiro (figura 9). Apesar dos inúmeros estudos, ainda não foi possível determinar com certeza a identidade destes recetores, havendo algumas teorias, como por exemplo as integrinas $\beta 1$. Também não há muitas certezas acerca do mecanismo de entrada do vírus, sendo a hipótese por macropinocitose uma das hipóteses que reúne maior consenso (Olejnik, Ryabchikova, Corley, & Mühlberger, 2011).

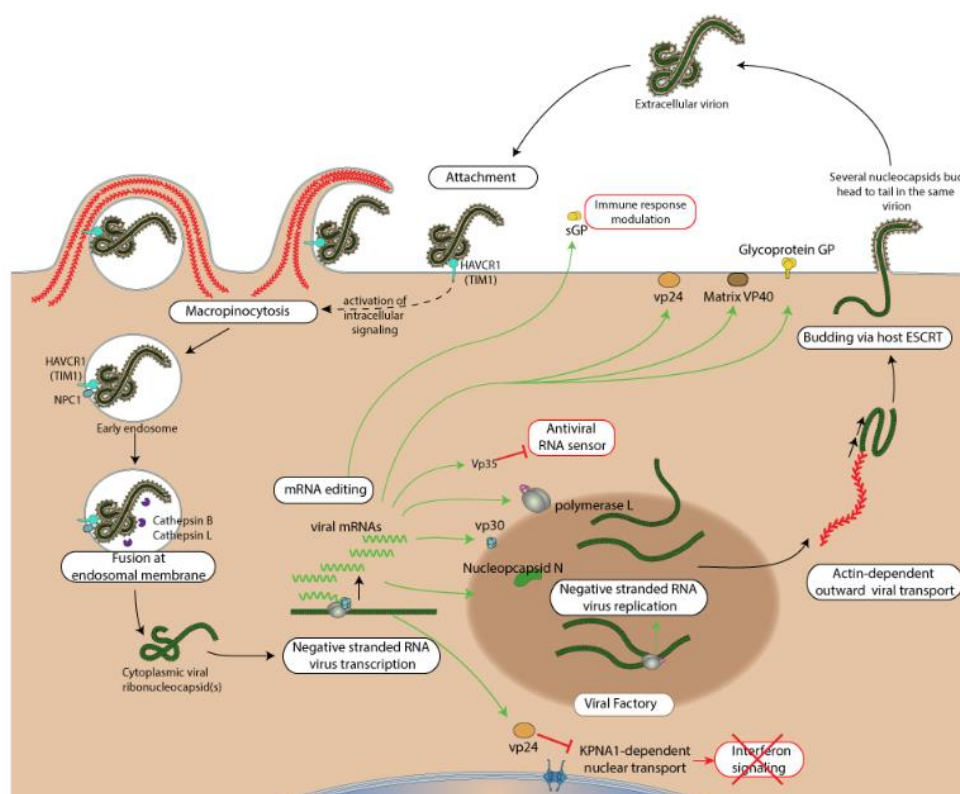


Figura 9 – Ciclo de replicação do vírus Ébola. Fonte: “Ebola cycle”, Viral Zone, Swiss Institute of Bioinformatics (2014).

As proteases de cistina catipsina B e L digerem a glicoproteína 1 (GP1) na sua forma de GP2 nos endossomas/lisossomas. Este passo é essencial para a fusão das membranas virais e celulares. É no lisossoma que a GP2 interage com a proteína transportadora de colesterol Niemann-Pick C1 (NPC1) que leva à libertação da nucleocápside para o citoplasma da célula infetada. O genoma é então replicado e copiado em antígenomas (RNA de sentido positivo) que são depois transcritos em cadeias de RNA de sentido negativo, para serem então integrados na progenia viral. Depois da tradução, as novas proteínas associam-se aos novos genomas em proximidade à membrana celular onde o vírus vai ser libertado (Olejnik et al., 2011).

- Vírus do Sarampo

O sarampo pode ser transmitido através de contato direto com gotículas infecciosas ou por propagação no ar (através da tosse ou espirro). O homem é o único hospedeiro deste vírus. O contágio pode ocorrer desde 4 dias antes e 4 dias após o início da erupção cutânea. É quase sempre uma doença benigna mas em alguns casos pode-se tornar grave ou mesmo fatal (Moss, 2017).

O vírus do sarampo tem uma estrutura esférica com um diâmetro entre 150 a 300 nm (figura 10). É envelopado, tem um genoma de RNA de cadeia simples linear e codifica oito proteínas (Kaić & Tešović, 2019).

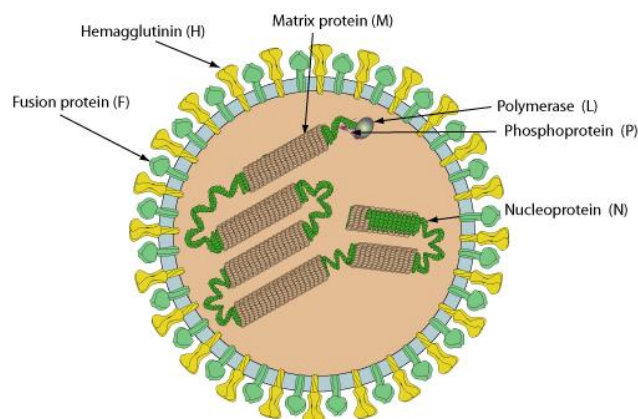


Figura 10 – Estrutura do vírus do sarampo. Fonte: “Morbillivirus”, Viral Zone, Swiss Institute of Bioinformatics (2014).

A adsorção ocorre quando a proteína H se fixa nos recetores da célula hospedeira. A proteína F muda de forma e promove a fusão da membrana celular com o invólucro viral, ocorrendo a penetração. De seguida dá-se a “libertação” da cápside com a exposição do genoma viral que vai ser transportado para o citoplasma, onde irá ocorrer a sua replicação. Com isto vai haver a produção de ácido nucleico e proteínas necessárias à produção de novos viriões. O primeiro passo da replicação do genoma viral é a produção de mRNA de cadeia positiva, pois a cadeia negativa não se consegue ligar aos ribossomas para ser traduzida nas proteínas precoces. De seguida o mRNA é traduzido nos ribossomas em proteínas e serve de molde para a síntese de cadeias complementares negativas, através da enzima RNA polimerase. Os componentes formados juntam-se de forma espontânea para haver a formação de novas partículas virais. No fim há a libertação de novos vírus por evaginação (figura 11) (Griffin, Lin, & Pan, 2012).

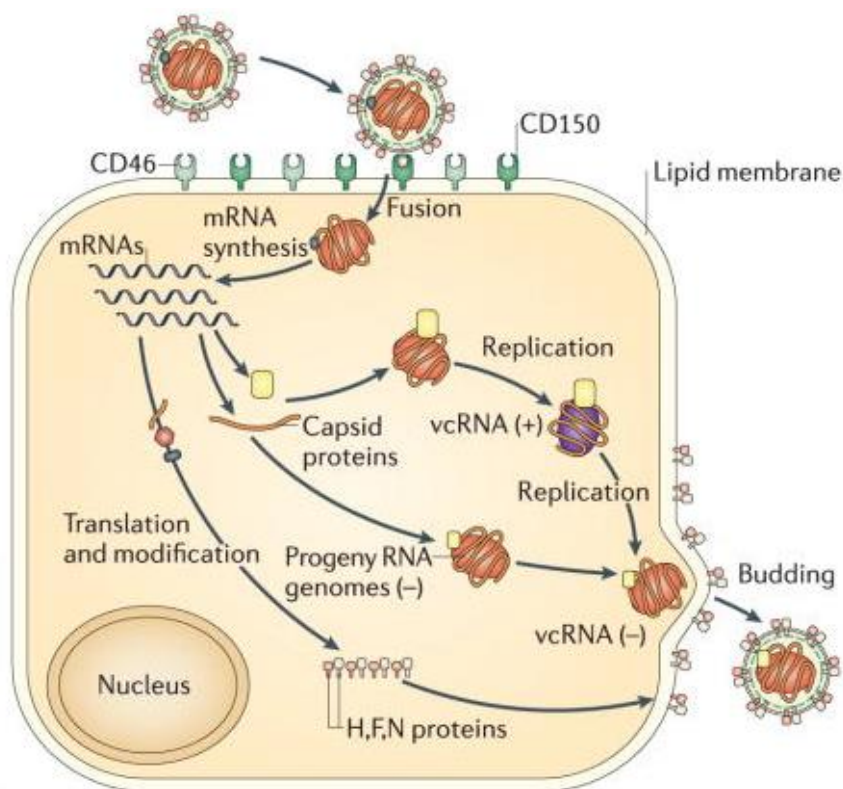


Figura 11 – Ciclo de replicação do sarampo. Fonte: Griffin et al.,(2012).

- Rotavírus

Os rotavírus são a causa mais comum de diarreia grave com desidratação associada em crianças. Estes vírus causam gastroenterite. Anualmente milhares de crianças são hospitalizadas devido a este vírus e também, sendo estes responsáveis por milhares de mortes, principalmente em países em desenvolvimento. O vírus transmite-se de pessoa para pessoa via oral/fecal principalmente se a pessoa infetada não tiver praticado uma boa higiene. Os rotavírus não são envelopados, são icosaédricos e com cerca de 80 nm de diâmetro (figura 12) (Trask, McDonald, & Patton, 2012).

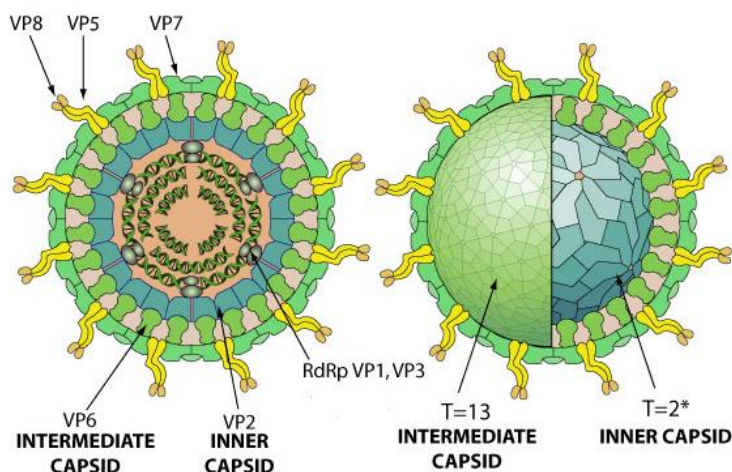


Figura 12 – Estrutura dos Rotavírus. Fonte: “Rotavirus”, Viral Zone, Swiss Institute of Bioinformatics (2011).

Os vírus penetram na célula através de um processo de endocitose e forma vesículas designadas por endossomas, e depende da VP4 (proteína viral), que se torna ativa após a clivagem em duas subunidades. A replicação ocorre no citoplasma. As proteínas da camada externa da cápside promovem a ruptura da membrana do endossoma o que desencadeia variações na concentração de cálcio intracelular que por sua vez vai condicionar a separação das camadas mais externas da cápside. O genoma mantém-se protegido enquanto que a enzima polimerase do RNA cria mRNA que vai ser responsável pela síntese de novas proteínas virais. Ocorre a acumulação de proteínas virais dentro dos viroplasmas. Estas estruturas são constituídas a partir da NSP2 e NSP5 e são como fábricas de produção de novas partículas virais mas se permanecem incompletas. Então estas partículas imaturas vão migrar até ao retículo endoplasmático onde se vão completar, havendo uma adição de uma camada extra, os vírus são depois libertados por lise (figura 13) (Silvestri, Taraporewala, & Patton, 2004).

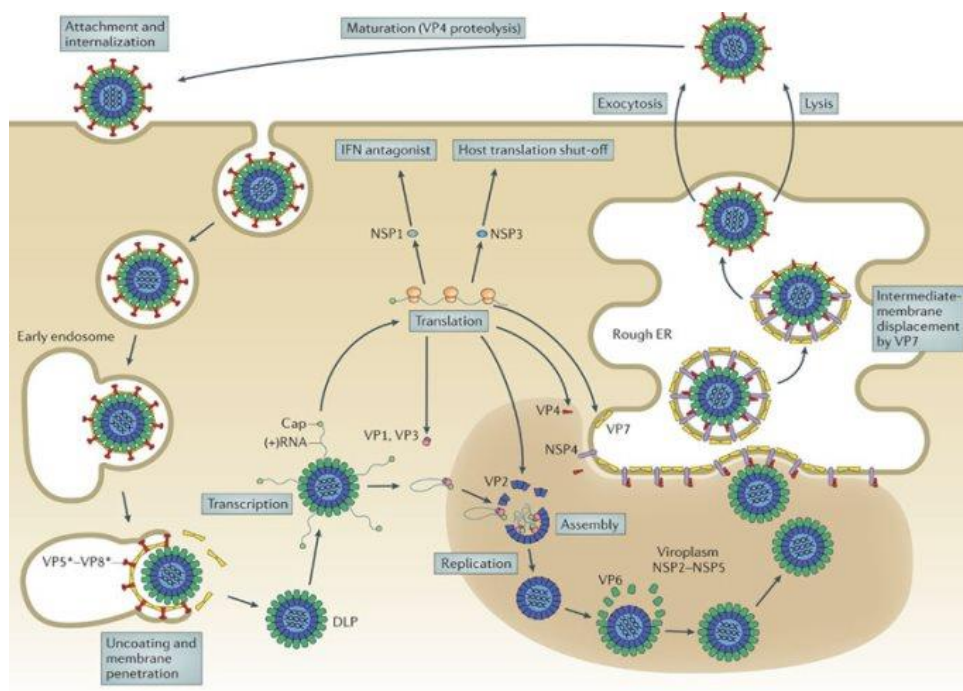


Figura 13 - Ciclo de replicação do Rotavírus. Fonte: Trask, McDonald, & Patton, (2012).

- Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

Segundo a WHO, em 2019, 38 milhões de pessoas vivem com HIV, mas apenas 67% que tem acesso a anti-retrovirais para tratamento da doença. Desse número, 7,1 milhões soube que tinha HIV apenas no ano 2019 e nesse ano morreram no total 690.000. Continua a ser um dos maiores problemas de saúde pública a nível global, tornando-se uma condição de saúde crônica, permitindo que as pessoas infectadas com este vírus tenham uma vida longa e saudável (Giroir, 2020).

A infecção por HIV pode ser provocada pelo HIV-1 ou pelo HIV-2. Pertencem ao grupo dos retrovírus. O HIV-1, é o responsável pela maioria das infecções, sendo que o HIV-2 apresenta uma maior prevalência na África Ocidental. Este vírus tem a capacidade de destruir progressivamente linfócitos CD4⁺ deixando as pessoas vulneráveis a infecções oportunistas. Pode eventualmente provocar a Síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) se a pessoa doente não for tratada a tempo (Loreto & Azevedo-Pereira, 2012).

Pertence à família *Retroviridae* e ao género *Lentivirus*. O genoma é constituído por duas cópias idênticas de moléculas de RNA de cadeia simples. A diferença entre os dois vírus é a organização do seu genoma, embora ambos tenham a estrutura básica de um retrovírus (presença de três genes estruturais, gag, pol e env), eles apresentam

uma combinação complexa de outros genes reguladores. A estrutura da partícula de HIV é semelhante para HIV-1 e HIV-2 (figura 14). É esférica, pleomórfico, tem de diâmetro entre 80 a 100 nm e é circundada por uma membrana rica em lipoproteínas. (Fanales-Belasio, Raimondo, Suligoi, & Buttò, 2010).

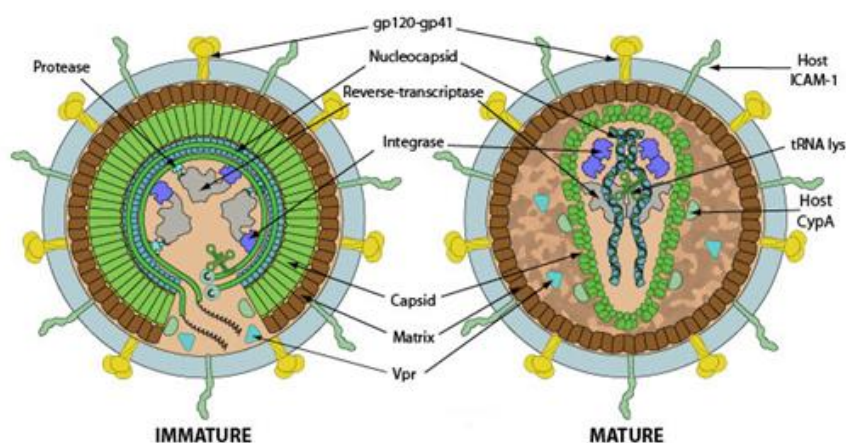


Figura 14 – Estrutura do vírus HIV-1 e HIV-2. Fonte: “Human immunodeficiency virus”, Viral Zone, Swiss Institute of Bioinformatics (2015).

O seu ciclo de replicação pode ser resumido em seis etapas: ligação e entrada, *uncoating*, transcrição reversa, integração do provírus, síntese e montagem de proteínas de vírus e *budding* (figura 15). O complexo trimérico do envelope viral é essencial para o reconhecimento do vírus à célula e para a sua entrada na célula (Fanales-Belasio et al., 2010). O vírus liga-se aos recetores CD4 hospedeiros através da gp120 e subsequentemente interage com um co-recetor de quimiocina. De seguida ocorre endocitose mediada por clatrina. A gp41 media a fusão dependente de dinamina com a membrana do hospedeiro. O nucleocápside é então libertado no citoplasma com desfibramento parcial. O genoma ssRNA + torna-se em dsDNA pela transcriptase reversa. De seguida dá-se a integração do dsDNA viral no genoma da célula mediada pela integrase, originando um provírus. Através da RNA Pol II dá-se a transcrição do provírus e produção de RNA virais e de seguida a sua tradução produz as proteínas tat, rev e nef, em que o rev medeia a exportação nuclear de RNA's não completamente processados. A tradução dos RNA's virais não processados produz gp Env, Gag e Gag-Pol. Dá-se então a montagem do virião na membrana celular do hospedeiro e o empacotamento do genoma do RNA viral. Por fim dá-se o *budding* através da membrana plasmática, de seguida a libertação dos viriões e o processamento proteolítico das

poliproteínas por protease viral e maturação dos viriões (Meulendyke, Croteau, & Zink, 2014).

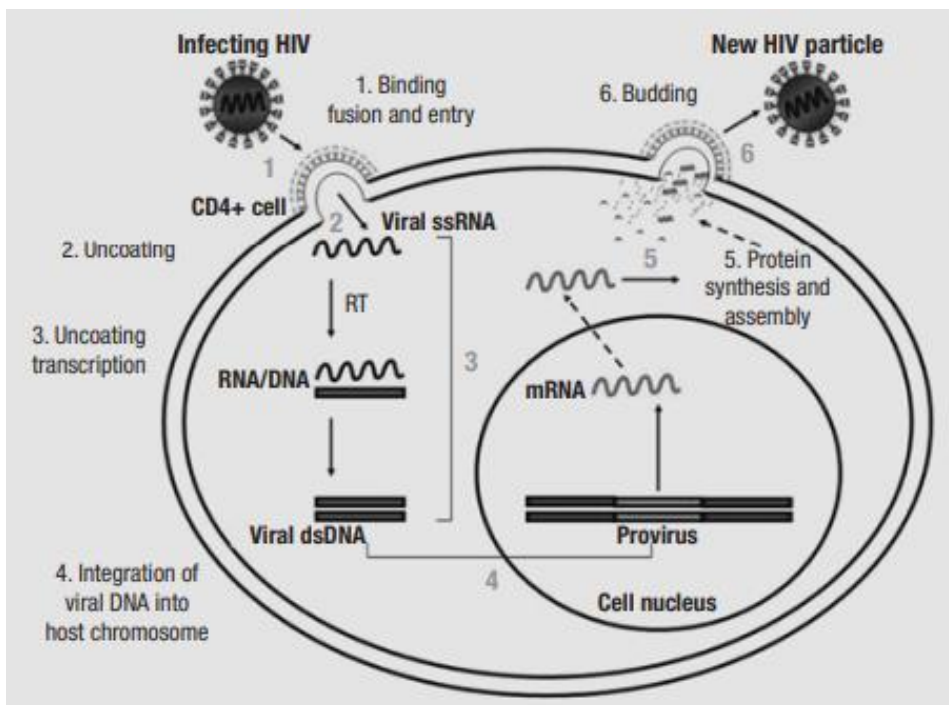


Figura 15 – Ciclo de replicação do HIV. Fonte: Fanales-Belasio et al., (2010)

Depois de ocorrer a infecção, o percurso patogénico ocorre em três etapas principais: Fase inicial ou primária, Fase assintomática ou de latência e a Fase sintomática (figura 16). A fase inicial é definida pelo primeiro dia de infecção até ao desenvolvimento de uma resposta imunológica e pode ter uma duração inferior a duas semanas. De seguida, o doente tem sintomas idênticos a uma gripe, como febre, mal-estar geral, diarreia, mialgias, vômitos, *rash*, cefaleia, entre outros. De seguida ocorre uma intensa replicação viral com disseminação visceral e pelos tecidos linfóides e uma diminuição de linfócitos T CD4⁺ e não ocorre qualquer resposta imunológica por parte do hospedeiro (Loreto & Azevedo-Pereira, 2012). Segue-se a fase assintomática onde ocorre a recuperação clínica com uma redução da carga viral, consequência de um desenvolvimento de resposta imunitária. É nesta fase que ocorre seroconversão com desenvolvimento de anticorpos, podendo dizer que nesta etapa se atinge um equilíbrio entre a replicação viral e a resposta imunitária do hospedeiro. A duração desta fase de latência pode chegar até aos 12 anos num indivíduo que não faz terapia anti-retroviral. Na fase sintomática, ocorre um grande aumento de carga viral e uma diminuição de

resposta imunológica devido à consequente diminuição gradual do número de linfócitos T CD4⁺, o que leva ao aparecimento de infeções oportunistas potencialmente graves e fatais. Este período pode durar de meses a anos (Loreto & Azevedo-Pereira, 2012).

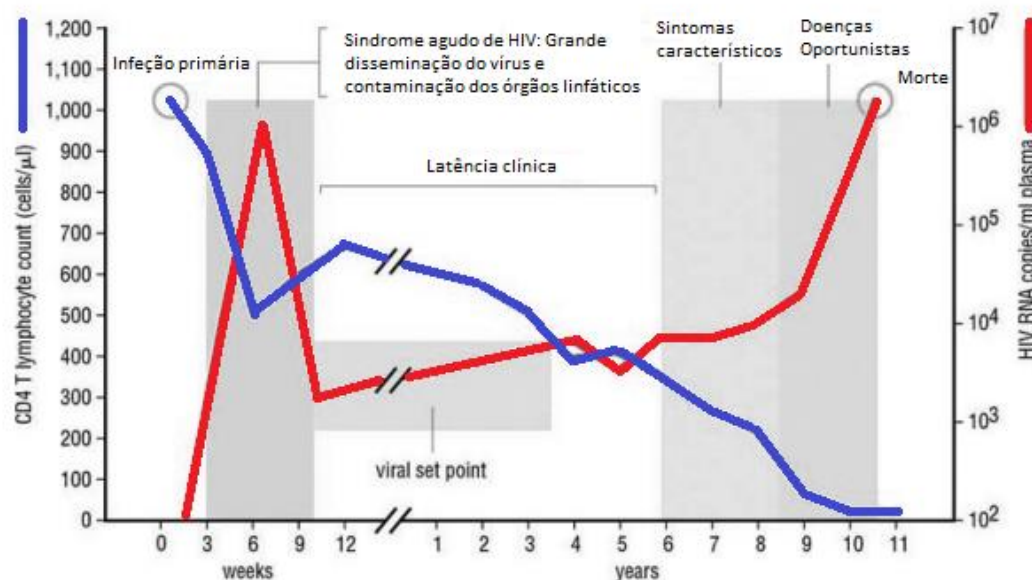


Figura 16 – Fases da infecção por HIV ao longo dos anos. Figura adaptada de: Loreto & Azevedo-Pereira, (2012)

Durante muitos anos tem-se tentado criar uma vacina contra o HIV, mas são vários os obstáculos. Um deles é o investimento financeiro em pesquisas, que na maioria são reduzidos e não são suficientes para continuar os estudos, outros fatores são a existência de poucos modelos animais que se mostraram adequados para os estudos, o facto de o próprio vírus estar em constante mutação, o que acaba por tornar ineficaz a ação da resposta imune estimulada pelas vacinas e a sua variabilidade genética e fenotípica, pois existem muitos subtipos de HIV (Guimarães, 2011).

- Vírus da Hepatite B

A Hepatite B é uma infecção viral que infecta células do fígado, pode causar doença aguda ou crónica. É extremamente contagioso e as suas principais vias de transmissão são os fluidos genitais - esperma e secreções vaginais, fluidos corporais – sangue, urina e saliva e leite materno. A doença é na maioria dos casos assintomática. Pertence à família *Hepadnaviridae* e do género *Orthohepadnavirus*. (Assis, Tenore, Pinho, Lewi, & Ferreira, 2015). O vírus é envelopado, esférico com um diâmetro de 42 nm (figura 17).

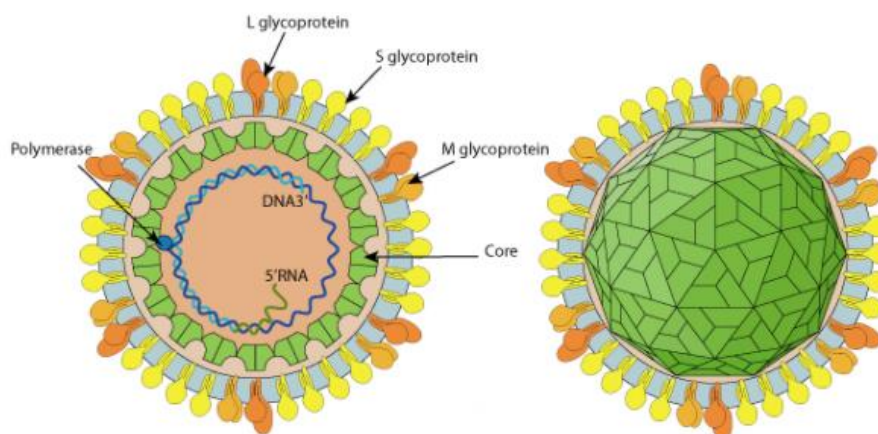


Figura 17 - Estrutura do vírus da Hepatite B. Fonte: “Hepadnaviridae”, Viral Zone, Swiss Institute of Bioinformatics (2009)

Após a entrada no organismo humano, o vírus liga-se aos recetores do hospedeiro e entra na célula por um mecanismo que ainda não é totalmente conhecido. O DNA circular relaxado (rc-DNA) e o capsídeo são transportados via microtúbulos para o núcleo onde o DNA vai ser libertado através do poro nuclear para formar o DNA circular covalentemente fechado (cccDNA). A transcrição feita pela RNA polimerase II do RNA pré-genómico (pgRNA) e mRNA's subgenómico, induzindo a síntese de todas as proteínas virais. O pgRNA é então encapsulado juntamente com a proteína P e transcrito dentro do nucleocapsídeo em DNA (-) covalentemente ligado à proteína P. A síntese vai gerar um novo rc-DNA e o seu transporte para o núcleo leva a amplificação do cccDNA. Como alternativa, os nucleocapsídeos que contêm rc-DNA são envolvidos no RE e novos viriões são libertados por exocitose (figura 18) (Beck & Nassal, 2007).

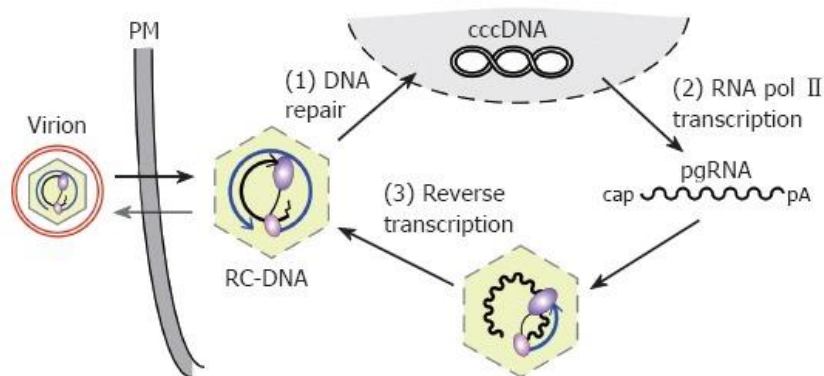


Figura 18 – Ciclo de replicação do vírus da Hepatite B. Fonte: Beck & Nassal,(2007)

- Vírus da Hepatite C

O vírus da Hepatite C pertence à família dos *Flaviviridae*, do género *Hepacivirus*. O vírus é envelopado, esférico com cerca de 50 nm de diâmetro (figura 19). A sua transmissão é mais comum através de sangue contaminado e tal como a hepatite B é assintomática ou com manifestações leves na maioria dos casos (Bukh, 2016).

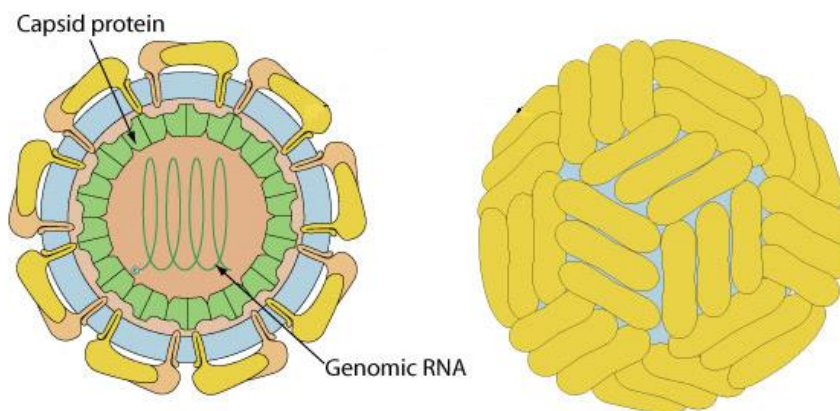


Figura 19 – Estrutura do vírus da Hepatite C. Fonte: “Hepacivirus”, Viral Zone, Swiss Institute of Bioinformatics (2017).

A sua replicação tem início quando a proteína E do envelope viral se liga aos recetores do hospedeiro e medeia a internalização na célula hospedeira por endocitose mediada por clatrina. De seguida dá-se a fusão da membrana dos vírus com a membrana endossómica do hospedeiro e o genoma do RNA é libertado no citoplasma. O ssRNA genómico de sentido positivo é traduzido numa GP que vai ser clivada em todas as proteínas estruturais e não estruturais para produzir as proteínas de replicação. A replicação ocorre na superfície do RE. Um genoma de dsRNA é sintetizado a partir do ssRNA genómico (+). O genoma de dsRNA é replicado fornecendo mRNA's virais de ssRNA (+). A montagem do vírus ocorre no RE e parece ser facilitada pelo canal iónico viral p7. O virião forma-se no RE e é transportado para o aparelho de Golgi. No fim dá-se a libertação de novos viriões por exocitose (figura 20) (Morozov & Lagaye, 2018).

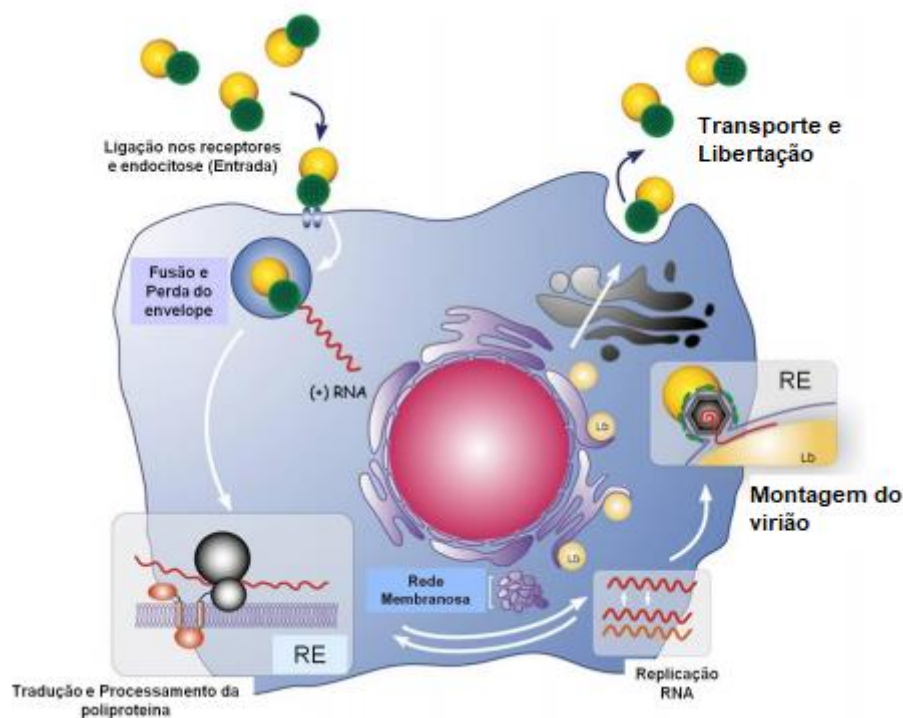


Figura 20 – Ciclo de replicação do vírus da Hepatite C. Figura adaptada de: Popescu et al., (2010)

- Vírus Influenza

Existem quatro tipos de vírus influenza – A, B, C e D. O vírus A e B são os que têm um maior impacto na vida humana pois são os causadores de epidemias anuais, apesar que o vírus influenza A está associado às aves e que ocasionalmente se adapta aos humanos causando pandemias. O vírus influenza B é responsável por surtos localizados em pequenas comunidades e o C causa uma gripe ligeira e por isso é o menos estudado (Rodrigues et al., 2007) e o vírus influenza D afeta principalmente o gado e não é conhecido que possa causar doença em humanos.

O vírus influenza A é dividido em subtipos baseados em duas proteínas à sua superfície: hemaglutinina (H) e a neuraminidase (N). Ao todo existem 18 subtipos de H hemaglutinina e 11 subtipos de neuraminidase. Apesar de poder haver 198 combinações possíveis, apenas 131 subtipos foram detetados na natureza. Já o vírus influenza B pode ser classificado em duas linhagens, B/Yamagata e B/Victoria (Taubenberger, Jeffery K. and Morens, 2008).

O vírus da Influenza pertence à família *Orthomyxoviridae*, é envelopado e tem um formato redondo mas é filamentosos. Os viriões têm entre 80 a 120 nm de diâmetro (figura 21) (Taubenberger, Jeffery K. and Morens, 2008).

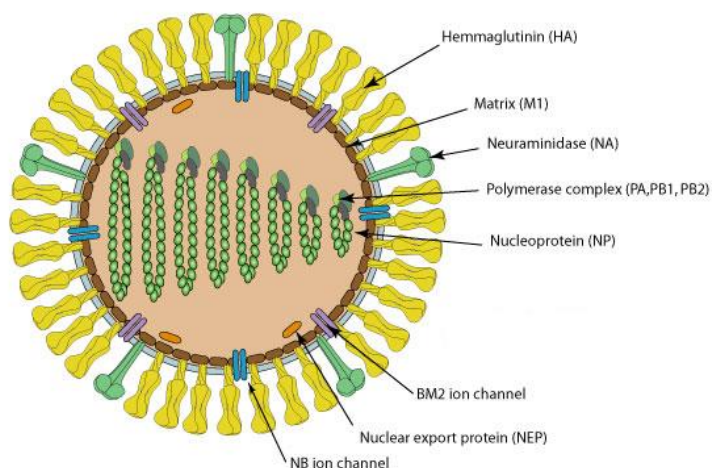


Figura 21 – Estrutura do vírus Influenza. Fonte: “Orthomyxoviridae”, Viral Zone, Swiss Institute of Bioinformatics (2010).

O vírus é transmitido normalmente por via aérea através de tosse e/ou espirros que propagam partículas que contêm o vírus. Pode também ser transmitido através de superfícies contaminadas (Taubenberger & Morens, 2008).

A sua replicação começa com a ligação do vírus ao recetor do ácido siálico através da proteína HA e é endocitado na célula hospedeira. A acidificação do endossoma vai induzir a fusão da membrana do vírus com a membrana da vesícula, e assim os segmentos de RNA encapsidados vão migrar para o núcleo. A transcrição de segmentos genómicos pela polimerase viral produz mRNA's que têm um CAP e são poliadenilados pela polimerase viral. De seguida dá-se a replicação de segmentos genómicos. Altos níveis da proteína M1 induz a exportação de segmentos de genomas do núcleo pela proteína NEP e por último dá-se a montagem e *budding* dos viriões que na membrana plasmática (figura 22) (Maeno, 1994).

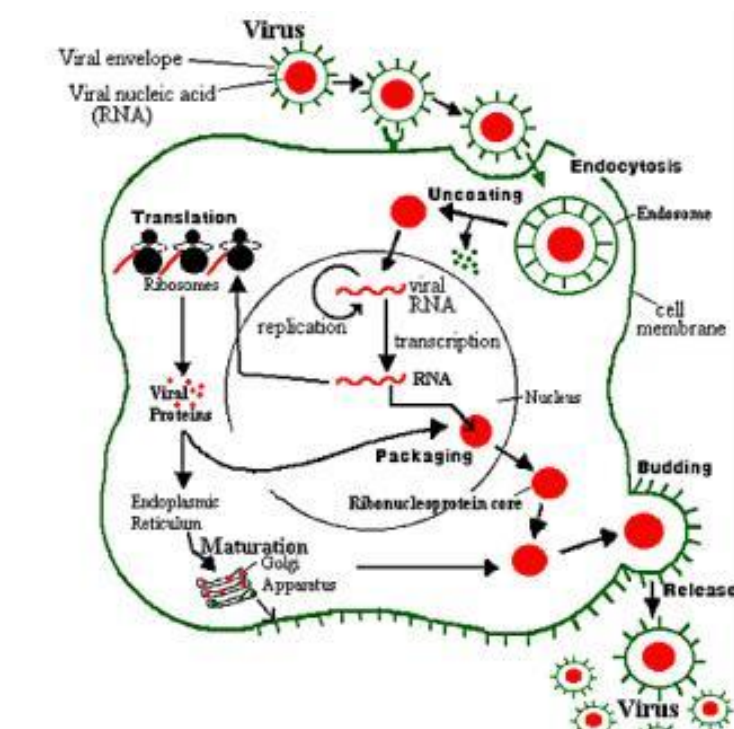


Figura 22 – Ciclo replicativo do vírus da Influenza. Figura adaptada de: Goldsby et al., Kuby immunology, (2000).

Atualmente as vacinas são a principal medida de prevenção contra o vírus da gripe. Segundo a WHO a vacina previne o risco da gripe entre 70 a 90% em hospedeiros saudáveis, 50 a 70% entre idosos e 50 a 85% das mortes por ano. Uma das desvantagens da vacina é que tem de ser tomada todos os anos, ou seja a proteção não é contínua uma vez que as estirpes que vão ser colocadas na vacina são escolhidas 9 a 10 meses antes com base nas estirpes circulantes e/ou com potencial de circulação (Rodrigues et al., 2007). Em Portugal a vacina utilizada no ano 2019 e 2020 foi a Influvac Tetra®. Esta vacina é trivalente, ou seja, contém 3 tipos de vírus inativado: Influenza A H1N1, H3N2 e do vírus influenza B.

- SARS-CoV-2

O nome de SARS-CoV-2 vem de Síndrome Respiratória Aguda Grave – Coronavírus 2. Foi detetado a primeira vez em Dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, na China. É uma doença zoonótica, ou seja, é transmissível entre animais e pessoas (Astuti, 2020). Segundo a WHO no final de Agosto de 2020 mais de 25,8 M de pessoas foram testadas como positivo para este vírus, e mais de 850.000 mortes em todo o mundo.

O vírus é envelopado, esférico, com cerca de 120 nm de diâmetro. O seu genoma de RNA, de cadeia simples positiva (+ssRNA), está associado à proteína N para formar a nucleocápside (figura 23) (Astuti, 2020).

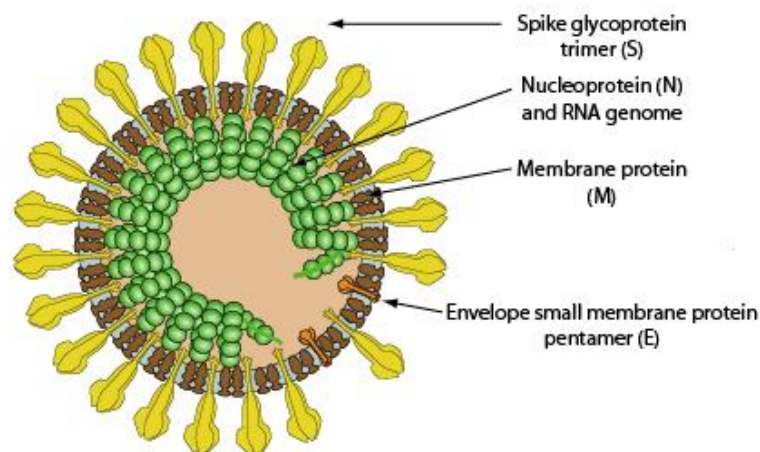


Figura 23 – Estrutura do SARS-CoV-2. Fonte: “Betacoronavirus”, Viral Zone, Swiss Institute of Bioinformatics (2020).

O vírus consegue entrar nas células do corpo humano através dos recetores ACE2 que se encontram em vários órgãos do nosso corpo, como o coração, pulmões, rins e o trato gastrointestinal, facilitando a entrada do mesmo (Astuti, 2020). Esta ligação depende da glicoproteína com o recetor ACE2 para internalização. A internalização resulta no desencapsulamento do RNA viral no citoplasma, que vai sofrer a tradução e vai gerar poliproteínas de replicase pp1 e pp1b que são posteriormente clivadas. A replicação do vírus envolve o deslocamento da estrutura ribossômica durante o processo de tradução e vai gerar réplicas genómicas e múltiplas espécies de RNA sub-genómica por transcrição necessária para proteínas virais relevantes. A “montagem” do virião ocorre através da interacção do RNA viral e da proteína presente no RE e no complexo de Golgi. Estes viriões vão ser posteriormente libertados das células por exocitose por vesículas (figura 24) (Kumar, Nyodu, Maurya, & Saxena, 2020).

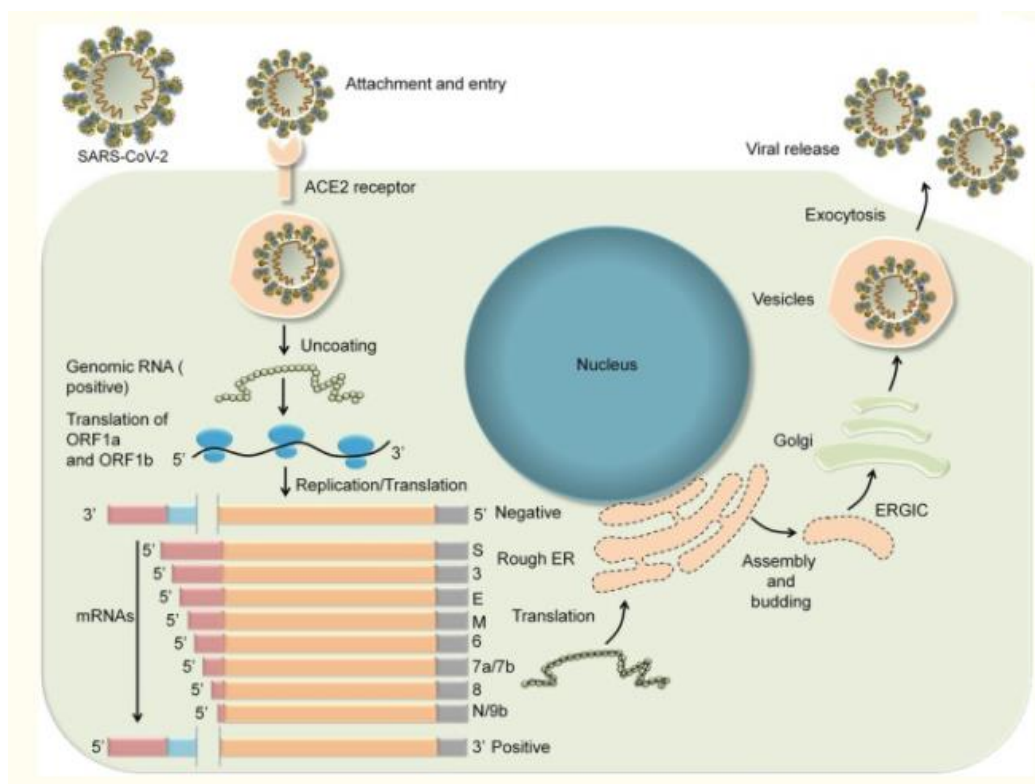


Figura 24 – Ciclo replicativo do SARS-CoV-2. Fonte: Kumar et al., (2020).

1.3. Vacinas

1.3.1. História da vacina

Na China, 1000 aC, a varíola era endêmica. Na tentativa de resolver este problema, foi desenvolvida a prática da variolação, que consistia na inoculação deliberada do vírus da varíola. No século XV os chineses também documentaram o uso da variolação, através de um método chamado de “insuflação nasal”, em que as pessoas, como forma de proteção, inalavam crostas secas de lesões de varíola, tipo rapé (tabaco que era inalado em vez de fumado), ou em modificações posteriores, inocularam o pus de uma lesão de um arranhão no antebraço (Gomes, 2003). Este método foi praticado durante séculos e mostrava ser altamente eficaz como prevenção mas havia sempre um risco associado, visto que o resultado da inoculação nunca foi dado como certo (Cann, 2012).

Este método acabou por ser levado para a Europa Ocidental, até que no século XVIII, Lady Mary Montagu, mulher do embaixador inglês em Istambul, usou o mesmo método mas extraindo o líquido de uma crosta de varíola e introduzindo na pele de

indivíduos saudáveis, diminuindo assim a taxa de mortalidade por varíola. O método foi implementado na Europa Ocidental, e foi largamente utilizado em Inglaterra e nos EUA até virem a público as investigações do médico inglês Edward Jenner, publicadas em 1798 (Gomes, 2003).

Jenner também investigou uma crença, comum entre os camponeses, de que os trabalhadores que lidavam com vacas doentes, infetadas com varíola das vacas, e que desenvolviam pústulas semelhantes à dos animais – uma condição benigna chamada de *vaccinia*, que significa vaca em latim, mas não eram contagiados com a varíola. Jenner inoculou um rapaz de 8 anos saudável, que nunca tinha tido varíola nem *vaccinia*, com pus da varíola das vacas. O rapaz teve sintomas benignos de *vaccinia* e posteriormente foi inoculado com o vírus da varíola humana e não desenvolveu a doença.

Por volta de 1885, Pasteur desenvolve a vacina e o tratamento contra a raiva, uma doença viral fatal, em geral transmissível ao homem pela mordedura dum mamífero infectado (N. S. D. O. Santos et al., 2015).

Desde Jenner, a vacinação tem permitido manter o controlo de mais de uma dezena de doenças infecciosas, em pleno século XX.

Apesar de não terem a sofisticação das vacinas actuais, as vacinas anteriores à 2ª Guerra Mundial foram suficientemente eficazes para reduzir drasticamente a morbilidade e mortalidade causada por várias doenças, dando credibilidade aos programas de prevenção contra doenças infecciosas (Gomes, 2003).

Em Portugal, o Plano Nacional de Vacinação (PNV) teve início em 1965, com o objetivo de vacinar a população, especialmente as crianças, de forma organizada, universal, gratuita e com continuidade. Podemos verificar em que ano se deu a entrada de certas vacinas virais. As alterações mais recentes ao PNV em Portugal são: a administração da vacina contra o Papilomavírus humano em rapazes a partir dos 10 anos e a vacina contra o rotavírus em crianças de grupo de risco, ambas a partir de Outubro 2020 (tabela 2).

Tabela 2 – Resumo da evolução da vacinação do PNV em Portugal – Introdução e retirada de vacinas entre 1965 e 2020 – Tabela adaptada de Fernandes, Teresa, Freitas, Graça, “Atualização do Programa Nacional de Vacinação: PNV 2017”, 2017; Mendes, Diana, Bessa, Sandra, “Nota de Imprensa – Programa Nacional de Vacinação atualizado em 2020”, 2019

	1965	1974	1980	1984	1987	1993	2000	2006	2008	2015	2016	2020
Varíola												
Poliomielite												
Sarampo												
Rubéola												
Parotidite epidémica (Papeira)												
Hepatite B												
Papilomavírus humano												
Vírus do Papiloma humano (nos homens)												
Rotavírus												

O PNV foi sendo atualizado desde de 1965, principalmente em duas vertentes:

- A introdução progressiva de vacinas no PNV, sendo este determinado por fatores epidemiológicos e pela disponibilidade de novas vacinas, mais eficientes e mais seguras;
- Atualização dos esquemas vacinais para uma melhor adaptação e adesão ao PNV (Fernandes & Freitas, 2017).

Entre 1900 e 1973 o uso das vacinas estava restrito a países industrializados, deste modo a cobertura geográfica à escala mundial era muito heterogénea. Hoje em dia, em que a vacinação foi implementada em grande escala, continuamos a observar o aparecimento de epidemias de doenças infecciosas. Até à data, apenas a varíola foi erradicada mundialmente (Korsman et al., 2012). A primeira implementação de vacinação em grande escala deu-se com a varíola, com o início em 1956 com a colaboração da WHO. O principal objetivo foi erradicar a doença. Deste modo conseguiu-se uma grande cobertura e em 1960 iniciou-se uma estratégia para identificar e isolar os casos, fazendo uma pesquisa e vacinar os indivíduos que estiveram em contato com pessoas infetadas. A doença foi erradicada por volta de 1960 nos países

industrializados e por volta de 1977 à escala mundial. Com este sucesso, a WHO criou em 1974 o programa “*Expanded Programme of Immunization*” (EPI). Este programa incluía seis vacinas: difteria, poliomielite, tétano, tosse convulsa, tuberculose e sarampo, mais tarde foram adicionadas a da febre-amarela e da hepatite B. Esta seleção foi feita com base na alta morbilidade destas doenças e na disponibilidade de vacinas baratas (Gomes, 2003).

Ao longo dos anos foram feitas algumas campanhas de vacinação para uma maior adesão à vacinação em Portugal (figura 25). Em Portugal, desde a sua criação, o PNV foi sempre pautado por características essenciais que marcaram o seu sucesso sendo as mais essenciais o facto de ser gratuito, financiado pelo estado e ser administrado por pessoas de confiança e em locais seguros (figura 26) (Fernandes & Freitas, 2017).

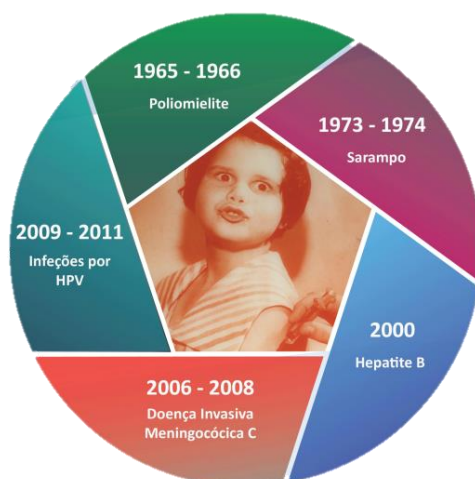


Figura 25 – Data de algumas campanhas de vacinação de 1973 a 2011 em Portugal. Fonte: “*Programa Nacional de Vacinação – 2017*”, site consulta: <https://www.dgs.pt/em-destaque/novo-programa-nacional-de-vacinacao-pdf.aspx> consultado a 04-01-2020



Figura 26 – Características essenciais da vacinação. Fonte: Fernandes, T.; Freitas, G.; “Atualização do plano nacional de vacinação PNV 2017”, DGS, 2017.

Nestes 54 anos, o desempenho do PNV tem sido notável, principalmente pela aceitação e adesão por parte do público, que permitiu alcançar anualmente grandes coberturas vacinais, tanto na vacinação de rotina como em campanhas de vacinação. Cerca de 95% das crianças com 1, 2, 7 e 14 anos de idade em 2015 tinham o PNV cumprido. Nos adultos, 76% dos que completaram 65 anos em 2015 tinham a vacina contra o tétano e difteria atualizada. Crianças de 8 a 18 anos de idade em 2015, 95% a 98% estavam vacinadas com duas doses da vacina contra sarampo, parotidite epidémica e rubéola, cumprindo assim um dos objetivos do Programa Nacional de Eliminação do Sarampo. A vacina contra HPV de 4 genótipos foi introduzida no PNV em 2008 em raparigas de 13 anos de idade, complementada com uma campanha que ocorreu entre 2009 e 2011. Como resultado destas medidas, 84% a 92% das raparigas com idades entre os 15 e os 23 anos, estavam vacinadas com o esquema de 3 doses da vacina HPV4. Estes resultados são exemplares a nível mundial (Fernandes, 2019).

Em Portugal, até 2017, houve ótimos resultados com a implementação da vacinação, temos registo de uma doença erradicada, a varíola, cinco doenças eliminadas, a poliomielite, difteria, sarampo, rubéola e tétano neonatal, sete doenças controladas, Tétano, *N. meningitidis C*, *H. influenzae*, hepatite B, parotidite epidémica, tosse convulsa e tuberculose, e como expetativa, o controlo do cancro do colo do útero (HPV) e *S. pneumoniae* (Fernandes & Freitas, 2017).

1.3.2. Tipos de Vacinas

As vacinas são preparações farmacológicas constituídas por substâncias imunogénicas capazes de induzir imunidade contra patógenos (Suh, Shin, & Kim, 2014). O desenvolvimento de vacinas profiláticas foi revolucionário para a saúde pública. Tornou-se possível provocar de modo intencional uma resposta imunitária que suprime a proliferação do vírus e a doença a ele associada (Suh et al., 2014).

Os vários tipos de vacinas são:

- Vacinas inativadas: São produzidas com vírus inativos, não são tão potentes como os atenuados, mas mantêm geralmente a imunogenicidade suficiente para induzir uma resposta por parte do sistema imunitário. Este tipo de vacina é bastante segura, visto que não há risco de multiplicação do agente que compõe a vacina no organismo, mas tem uma desvantagem uma vez que induzem uma imunidade geralmente menos duradoura, o que implica muitas vezes a necessidade de repetir as doses da vacina, aumentando o custo e reduzindo a taxa de adesão. Este tipo de vacina confere uma proteção essencialmente através da indução de células T CD4⁺ e de mecanismos humorais (Kang, Kim, & Compans, 2012).
- Vacinas vivas atenuadas: são formas de microorganismos em que a sua virulência é comprometida para inibir a ocorrência da doença, mas apenas o suficiente para manter a sua imunogenicidade. Esta vacina tem como vantagem o envolvimento de todos os componentes do sistema imunitário, conseguindo-se assim uma resposta imunitária completa e com uma duração em geral mais longa. A desvantagem é o facto de poder provocar vários efeitos adversos, e o grau de atenuação pode induzir uma resposta imunitária baixa (Suh et al., 2014).

Ambas vacinas têm sido bem-sucedidas, contudo, o desafio nesta área é crescente. Tenta-se desenvolver novas estratégias de vacinas com capacidade de induzir uma boa resposta imunitária, tanto em doenças infecciosas virais agudas como nas doenças infecciosas virais crónicas (Berzofsky et al., 2004).

- Vacinas de DNA: São uma estratégia promissora para imunização contra uma variedade de agentes patogénicos. Têm o potencial para induzir potentes respostas imunes celulares e podem ser administradas repetidamente. São vacinais estáveis, extremamente fáceis de manipular, de fabricar e seguras, permitindo que sejam geradas novas vacinas muito facilmente. Estas vacinas

são constituídas por um plasmídeo bacteriano, é o vetor mais utilizado neste tipo de vacinas. A vacina é baseada na tecnologia do DNA recombinante que envolve a transferência de um determinado gene (transgene), que codifica uma proteína (imunógeno), dentro de um vetor de expressão para células eucarióticas, as vacinas de DNA geneticamente modificado e expressos *in vivo* têm como objetivo induzir a resposta imunitária contra os antígenos recombinantes codificados, imitando as infecções naturais (Kano, Vidotto, & Vidotto, 2007). Podemos observar alguns fatores importantes para a formulação e inoculação de vacinas de DNA para melhorar a eficiência da transfeção *in vivo* e a imunogenicidade do antígeno (figura 27).

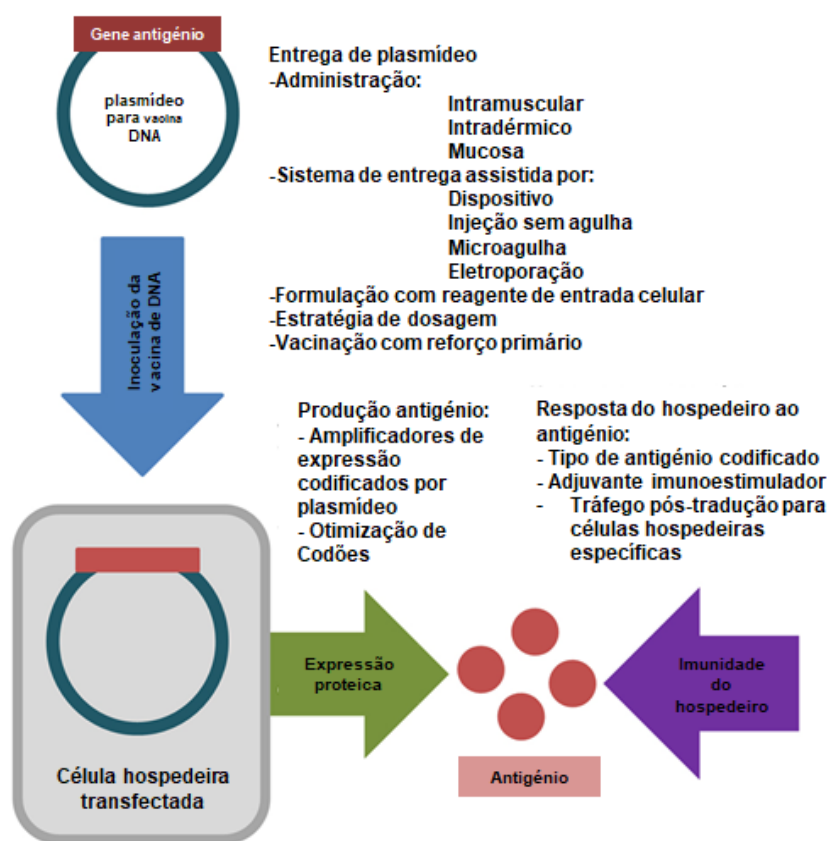


Figura 27 – Fatores chave considerados no projeto, formulação e inoculação de vacinas de DNA para melhorar a eficiência da transfeção *in vivo* e a imunogenicidade do antígeno – Figura adaptada de: Yi, Lee, Izzard, & Hurt, (2018).

- Vacinas baseadas em proteínas recombinantes: são produzidas através de sistemas heterólogos de expressão de proteína, como bactérias, leveduras ou baculovírus (Geels & Ye, 2010). Estas vacinas dependem da aptidão de um ou vários antígenos para induzir imunidade contra o agente patogénico em causa. Apresentam algumas vantagens, tais como a não manipulação do agente patogénico durante a produção e podem ser produzidas mesmo quando existe pouca informação do agente patogénico (Nascimento & Leite, 2012). Dentro desta categoria temos as vacinas baseadas em VLP's (Partículas Semelhantes a Vírus): as VLP's não têm invólucro. Caracterizam por ter uma morfologia semelhante ao vírus sem, contudo, conter o DNA viral, responsável pelos danos da infecção por esse agente (Zardo et al., 2014). Já foram licenciadas duas vacinas contra o HPV baseadas em VLP's – a Gardasil®, que é produzida a partir de leveduras e a Cervarix® produzida a partir de células de insecto. Em ambas as vacinas a proteína da cápside L1 é capaz de se “montar” sozinha e de formar VLP's imunogénicas, capazes de induzir elevados títulos de anticorpos neutralizantes (Ma et al., 2012).
- Vacinas baseadas em vetores virais: são utilizados vírus atenuados, não patogénicos, como vetor para genes que codifiquem antígenos, estimulando tanto a imunidade humoral como a celular (Da Silva & Richtmann, 2006). Os vetores são manipulados para aumentar a segurança e a imunogenicidade. Vacinas baseadas no vetor de vírus são veículos utilizados para a entrega do gene de interesse à célula hospedeira para a expressão. Vai ocorrer a inserção de material genético que codifica antígenos no genoma de um vírus inofensivo resultando na criação de um vírus recombinante. Estes vetores ativam a imunidade inata sem risco associado a patogenicidade ou infeção. Podem ser produzidos a partir de culturas celulares em grandes quantidades (Singh et al., 2010).
- Vacinas baseadas em vetores não virais. Ainda nenhuma vacina licenciada usa este método, mas estão várias a ser estudadas (Callaway, 2020). Estes vetores são geneticamente modificados para que não possam se replicar. Depois são modificados para produzirem proteínas de modo a provocar uma resposta imune quando administrados. Este tipo de vacina tem atraído grande atenção devido às suas vantagens que estes vetores têm em relação aos vetores virais, tal como uma maior segurança, resposta imunitária mais reduzida, fácil preparação a baixo custo e em grandes quantidades e a possibilidade de armazenar durante longos períodos de tempo (Pereira, 2014).

- Vacinas baseadas em péptidos: são constituídas por fragmentos imunogénicos de proteínas virais e são obtidas laboratorialmente. Estas vacinas induzem uma resposta muito específica porque o péptido é apresentado pelas moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) às células T CD4+ e CD8+, desta forma, é uma das vantagens destas vacinas relativamente às outras. Contudo, para a indução destas células é necessário a existência de células T disponíveis para reconhecer o péptido (Huber, van Beek, de Jonge, Luytjes, & van Baarle, 2014).

1.3.3. Estratégias de produção de vacinas

Existem várias estratégias de produção de vacinas, que iram ser descritas de seguida, apresentando também algumas vantagens e desvantagens das mesmas.

- Vacinas produzidas em ovo: Foi por volta de 1930 que foi iniciada a produção com alguns vírus, como por exemplo o da varíola. Este tipo de vacinas requerem meses de produção para se obter quantidades suficientes de antígeno, afetando assim a disponibilidade das vacinas. Existem outras limitações, como a necessidade de obter aves certificadas, a adaptação da estirpe do vírus, a possível contaminação dos ovos e a contra indicação da administração da vacina em pessoas alérgicas à proteína do ovo (Tang, Zhang, Toro, Shi, & Van Kampen, 2009). Estão descritas algumas vacinas em meio de cultura biológica de embriões de galinha (tabela 3).

Tabela 3 – Vacinas produzidas em meio de cultura biológica derivado de embriões de galinha. Tabela adaptada de: Alves, Gaspar, Ângela, & Ferreira (2007).

Vacinas Virais	Meio de desenvolvimento
Febre-amarela	Embrião de galinha
Influenza	Líquido extra-embriónico de galinha
Raiva	Fibroblastos de embrião de galinha
Sarampo	
Parotidite epidémica	

- Vacinas independentes do ovo: devido às limitações que foram descritas anteriormente das vacinas produzidas em ovo, desenvolveram novas estratégias

de produção. Uma delas é então a produção à base de cultura de células. Apresentam um tempo de produção mais curto comparativamente com a vacina anterior, são fabricadas em biorreatores fechados para reduzir ao máximo contaminações exógenas (Singh et al., 2010). É um método de produção fiável, flexível e permite o crescimento de uma ampla gama de estirpes de vírus. Tal como a anterior apresenta algumas limitações tais como: risco de contaminação, exigência de novas instalações para produção, instabilidade das células e dificuldade de identificar as células apropriadas para a produção das vacinas (Chua & Chen, 2010).

- Partículas semelhantes a vírus - VLP's: são nanopartículas constituídas por cápsides proteicas desprovidas de material genético tornando-as não infecciosas, mas são capazes de promover a interação ligando-recetor, aumentando a resposta imunitária (Kang et al., 2012). Podem ser produzidas por um sistema de expressão de baculovírus e células de insectos permitindo a produção em larga escala, mas também pode ser produzido por um sistema de expressão à base de plantas. Esta estratégia é mais segura visto que não há o risco de infecções em humanos por agentes virais das plantas. Existem dois métodos de inoculação, infetar a planta com o vetor do vírus ou inocular por agroinfiltração as plantas, isto é, através da incorporação do vetor do vírus na bactéria *Agrobacterium tumefaciens* e infiltrando-a na folha através de uma seringa ou em vácuo. Os mais utilizados são o TMV, vírus da batata X (PVX) e os vírus do mosaico do pepino (Hefferon, 2014).

1.3.4. Vias de imunização

As vias de imunização são muito importantes, visto que podem influenciar grandemente a imunogenicidade das vacinas.

- Via intramuscular: este tipo de via permite uma rápida absorção (cerca de 20 minutos) e é ideal quando se tem que administrar uma quantidade superior de volume (comparado com a via subcutânea).
- Via subcutânea: este tipo de via serve para manter um fluxo mais lento da vacina pelos capilares sanguíneos. Têm que ser administrada em quantidades pequenas, geralmente 1 mL.
- Via transdérmica: é uma via vantajosa devido aos benefícios da pele, pois debaixo do estrato córneo há uma rede de células apresentadoras de antígenos.

Através das microagulhas consegue-se uma maior eficácia pois deste modo consegue-se atingir as células apresentadoras de antígeno. (Suh et al., 2014).

- Via intranasal: esta via não requer a utilização de agulhas, logo é bastante aceite por pessoas com fobia a agulhas e crianças. Esta via tem a capacidade de induzir imunidade específica para o antígeno, a nível sistémico e a nível da mucosa. Deste modo, vai proporcionar uma proteção contra organismos patogénicos que o primeiro contato seja à superfície de uma mucosa, como por exemplo o HPV, o vírus influenza, entre outros (Staats & Thompson, 2011). Nas vacinas baseadas em VLPs, foram observadas imunidade protetora quer por via intranasal quer por via intramuscular. No caso do HPV, a administração da vacina via nasal induziu títulos elevados de anticorpos na vagina. Na administração da vacina via vaginal, também foram detetados elevados títulos de anticorpos no colo do útero. Logo, a combinação de ambas as vias de administração pode ser um método promissor utilizado para prevenir tanto a infeção inicial como a disseminação do vírus (Gersch, Gissmann, & Garcea, 2012).
- Via oral: Estudos demonstram que a vacinação através da mucosa oral é muito eficaz. A área bucal tem acesso direto à circulação sistémica através da veia jugular interna, o que permite que a substância ativa evite a hidrólise ácida no trato gastrointestinal e contorne o metabolismo hepático de primeira passagem. Deste modo leva a uma alta disponibilidade do medicamento e consegue-se reduzir a quantidade da dose. A permeabilidade da mucosa bucal é aproximadamente 2-2.000 vezes maior que a da pele mas menor que a do intestino. Uma das desvantagens é que a área bucal é menor comparativamente com as outras áreas de absorção (estômago, intestino) e a deglutição da saliva pode potencialmente levar à perda de fármaco dissolvido ou suspenso e levar à remoção involuntária da forma de dosagem (Uddin, Allon, Roni, & Kouzi, 2019).

1.3.5. Comparação da eficácia/segurança e custo/benefício entre vacinas

Está comprovado que a vacinação é eficiente na prevenção de doenças infecciosas graves. As vacinas são um dos produtos farmacêuticos com melhor relação custo/benefício, comparado com os fármacos que precisam de ser administrados a longo prazo em caso de doença. Antes de obter uma licença, as vacinas são testadas em ensaios clínicos controlados randomizados. Estes ensaios servem principalmente

para avaliar a segurança e eficácia da vacina e identificar possíveis efeitos adversos. Alguns efeitos adversos só ocorrem passado muito tempo após a vacinação, sendo assim existem dois sistemas de vigilância, o *Vaccine Adverse Event Reporting System* (VAERS) e o *Safety Datalink Vaccine* (VSD) que foram criados para monitorizar a segurança das vacinas após o seu licenciamento. O VAERS é co-patrocinado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (Smith, 2018).

O benefício das vacinas só pode ser demonstrado através de ensaios clínicos de qualidade, já que se trata de uma ação preventiva. Mesmo usando as vacinas mais seguras disponíveis no mercado, a vacinação ainda induz um conjunto de efeitos adversos, raros, mas o suficiente para por vezes levantar questões acerca do perfil de segurança das vacinas (Orensteina & Ahmedb, 2017).

A varíola é um dos exemplos em que se conseguiu a erradicação de uma doença através da vacinação. Segundo a WHO, num período de 10 anos, os custos do programa de erradicação foram de 100 milhões USD mas conseguiu-se poupar num total de 1.35 mil milhões USD em tratamentos.

A poliomielite é uma doença viral e muito infecciosa, que invade o sistema nervoso e pode causar paralisia parcial ou total. 1 em cada 200 casos pode resultar em paralisia irreversível. Nos anos setenta, com a vacinação nos EUA e em Itália, conseguiu-se calcular que seriam evitadas 855.000 mortes, 4 milhões de casos de paralisia e 40 milhões de DALY's (*Disability Adjusted Life Years*) em caso de vacinação, globalmente. O programa da vacinação contra a poliomielite custará cerca de 67 biliões de USD se continuarem os esforços de erradicação e subsequente suspensão da necessidade de vacinação, e os custos de cuidados médicos evitados entre 1970 e 2050 serão de 128 milhões de US dólares (Carneiro, Belo, Gouveia, Costa, & Borges, 2011).

Em relação ao HVP, a vacinação em crianças com 12 anos de idade ronda os 58 milhões de meninas, e o custo das mesmas está entre os 4500 milhões de USD, mas foram impedidos 690.000 casos de cancro no colo do útero e 420.000 mortes também relacionadas com o cancro do colo do útero (Jit, Brisson, Portnoy, & Hutubessy, 2014).

Foi avaliada a eficácia das vacinas contra o HPV em ensaios clínicos utilizando lesões de CIN (neoplasia cervical intraepitelial) de grau 2 ou superior (CIN2+), de grau 3 ou superior (CIN3+) e em infeções persistentes de 6 meses por HPV, em mulheres com idade inferior a 25 anos e com as três doses de vacina, mulheres com idade superior a 25 anos e com as três doses da vacina e também a duração da proteção por mais de cinco anos após vacinação em mulheres entre os 16 e 25 anos de idade (Murillo & Ordóñez-Reyes, 2019). Está comprovada a eficácia da vacina e a mais-valia que advém da sua administração tanto em mulheres com idade inferior a 25 como em idade

superior a 25, visto que a sua percentagem de eficácia nunca é inferior a 91% (tabela 4) (Murillo & Ordóñez-Reyes, 2019).

Tabela 4 – Estudos clínicos sobre a eficácia da vacina contra HPV – tabela adaptada de: Murillo & Ordóñez-Reyes (2019)

Proteção contra HPV 16/18 e lesões associadas			
	Infeção resistente de 6 meses	CIN2+	CIN3+
Vacinação em mulheres com idade inferior a 25 anos com três doses da vacina			
No geral	94%	93%	93%
Vacina Bivalente	94%	98%	92%
Vacina Quadrivalente	96%	98%	97%
Vacinação em mulheres com idade superior a 25 anos com as três doses da vacina			
No geral	89%	84%	-
Vacina Bivalente	91%	84%	-
Vacina Quadrivalente	85%	83%	-
Duração da proteção por mais de 5 anos de vacinação em mulheres entre os 16-25 anos de idade			
No geral	95%	-	-
Vacina Bivalente	100%	100%	-
Vacina Quadrivalente	-	100%	100%

Muitos países de médio e alto rendimento verificaram uma redução na incidência e mortalidade por cancro do colo do útero apenas pela introdução da citologia. Embora seja um exame que está disponível na maior parte dos países do mundo, este exame é insustentável na maioria dos países de baixo rendimento (Murillo & Ordóñez-Reyes, 2019).

As infeções pelo vírus influenza são responsáveis por 30.000 mortes, mais de 200.000 hospitalizações e mais de um milhão de consultas ambulatoriais, isto apenas nos EUA. Vacinar pessoas entre os 15 e os 65 anos de idade com a vacina contra a influenza economiza cerca de 25 USD por pessoa, pois é o que se gastaria a mais se a pessoa não fosse vacinada e tivesse que receber tratamento. Por isso, também neste caso, vacinar é um benefício e compensa em muito o custo gasto na vacinação (Muennig & Khan, 2001).

2. METODOLOGIA

Como objetivo de recolha de dados apresentada nos tópicos de resultados seguintes, foi feita uma recolha de informação maioritariamente através da base de dados “WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system. 2020 global summary” da WHO, que estão disponíveis para consulta no site:

“https://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary” (figura 28).

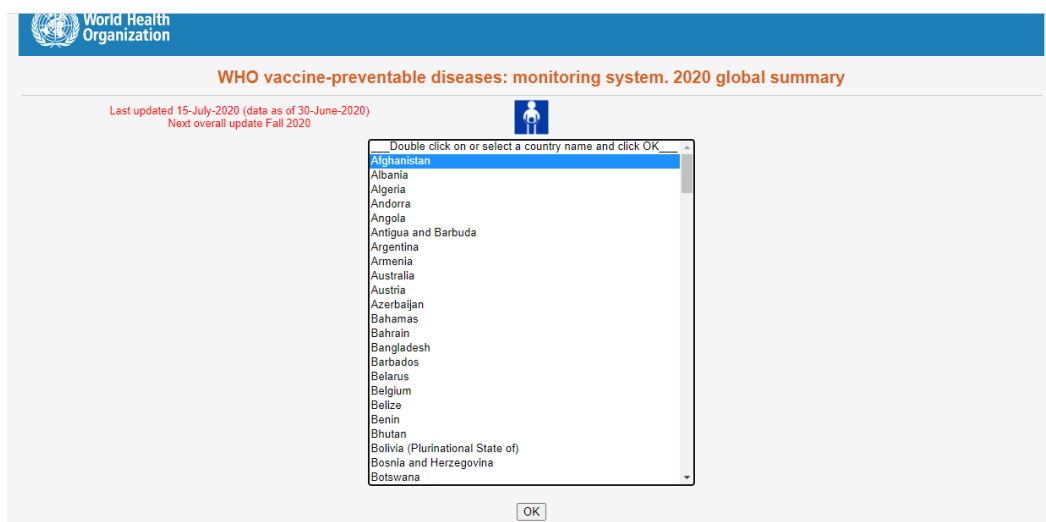


Figura 28 – Exemplo do modo de pesquisa na base de dados no site WHO

De seguida, escolhendo país a país dos 194 países, aparece o ano de introdução/vacinação de algumas vacinas, entre elas vacinas anti-virais (figura 29). Então deste modo, toda a informação foi transferida para Excel. Os dados foram recolhidos para os 194 países listados e apenas para as vacinas anti-virais com informação disponível, sendo elas a vacina contra: Rotavírus, Hepatite B, Encefalite Japonesa, Febre-amarela, Poliomielite (IPV) e uma vacina tripla contra o Sarampo, Rubéola e a Papeira (RCV). Assim foi possível contabilizar o número de países que introduziram cada vacina e em que ano e construir um gráfico com essa informação. Apenas foi contabilizado vacinas introduzidas depois do ano 2000 e até 2019. As vacinas introduzidas antes desse ano não foram contabilizadas neste estudo.

WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system. 2020 global summary

Coverage time series for Equatorial Guinea (GNQ)
Last updated 15-July-2020 (data as of 30-June-2020)
Next overall update Fall 2020

Vaccine	2019	2018	2017	2016	2015	2014	2013	2012	2011	2010	2009	2008	2007	2006	2005	2004	2003	2002	2001	2000	1999	1998	1995	1990	1985	1980
BCG	63	55	50	46	35	64	51	53	53	58	68	71	55	47	42	58	60	91	73	34	48	—	99	—	28	—
DTP1	67	54	50	42	26	57	47	54	42	59	104	80	62	54	51	60	67	86	32	39	—	—	—	—	—	—
DTP3	61	48	48	33	17	45	24	41	54	44	74	74	41	34	34	48	41	65	32	32	40	—	64	—	3	—
HepB3	61	45	48	33	17	45	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Hib3	61	46	48	33	17	45	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
IPV1	60	45	45	12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
JapEnc	65	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MCV1	51	39	53	29	26	43	41	34	50	51	77	78	37	25	24	33	36	51	52	19	24	—	61	—	11	—
PAB	—	—	—	—	27	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PCV1	—	—	48	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pol3	61	45	46	30	27	52	40	40	53	39	68	73	42	35	34	48	42	72	33	32	40	—	64	—	4	—
TT2+	40	41	39	23	23	35	31	30	64	54	57	45	33	28	25	29	33	13	13	30	—	—	63	—	16	—
VAD1	55	45	52	26	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
YFV	46	30	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Employment | Other UN Sites | Search | Suggestions | RSS | Privacy
© World Health Organization 2020. All rights reserved

Figura 29 – Formato em que os dados dos países que introduziram vacinas anti-virais são apresentados na base de dados da WHO

3. VACINAS ANTIVIRAIS QUE ENTRARAM NO PLANO DE SAÚDE, A NÍVEL MUNDIAL

Desde o ano 2000 até 2019 a população a nível global passou de 6,103.694 mil milhões para 7,586.693 mil milhões. A razão para o aumento populacional e diminuição do número de óbitos deve-se em grande parte à vacinação, à sua evolução e introdução de novas vacinas no Plano de vacinação de inúmeros países. Infelizmente nem toda a população mundial tem acesso a todas estas vacinas, porque o país ainda não introduziu a mesma ou porque o país não comparticipa a vacina e o seu custo é impedimento para a sua administração sem qualquer tipo de comparticipação. Mas felizmente os Planos de Vacinação estão sempre em alteração e adaptação. A título de exemplo, pelo menos duas vacinas estão a ser incluídas no plano em Portugal e que estão a ser introduzidas anualmente noutros países.

Neste estudo está assinalada a introdução de seis vacinas em todos os 194 países, sendo essas vacinas contra o Rotavírus, Hepatite B, Encefalite Japonesa, Febre-amarela, Poliomielite (IPV) e uma vacina tripla contra o Sarampo, Rubéola e a Papeira (RCV) (figura 30).

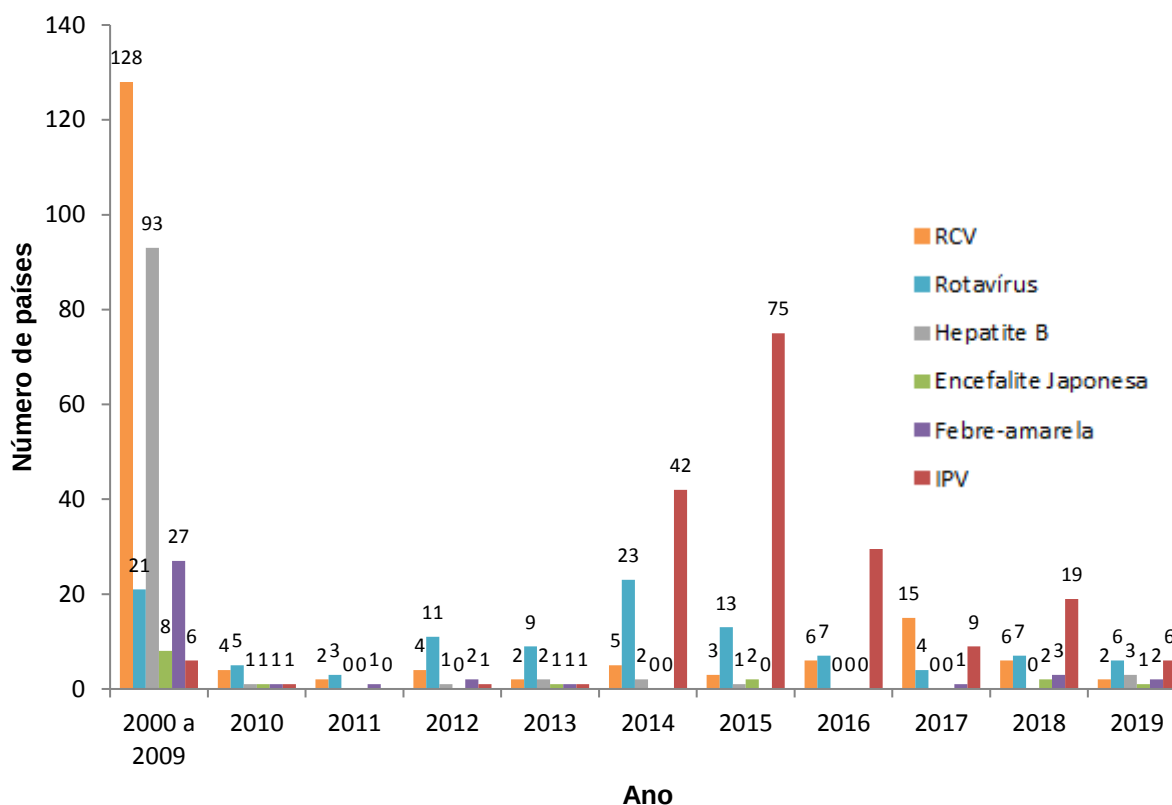
Número de países que introduziram vacinas anti-virais entre 2000 e 2019

Figura 30 – Número de países que introduziram algumas vacinas anti-virais de 2000 a 2019 de acordo com a base de dados da WHO. RCV – vacina tríplice viral contra o sarampo, rubéola e papeira. IPV – Vacina inativada contra poliomielite

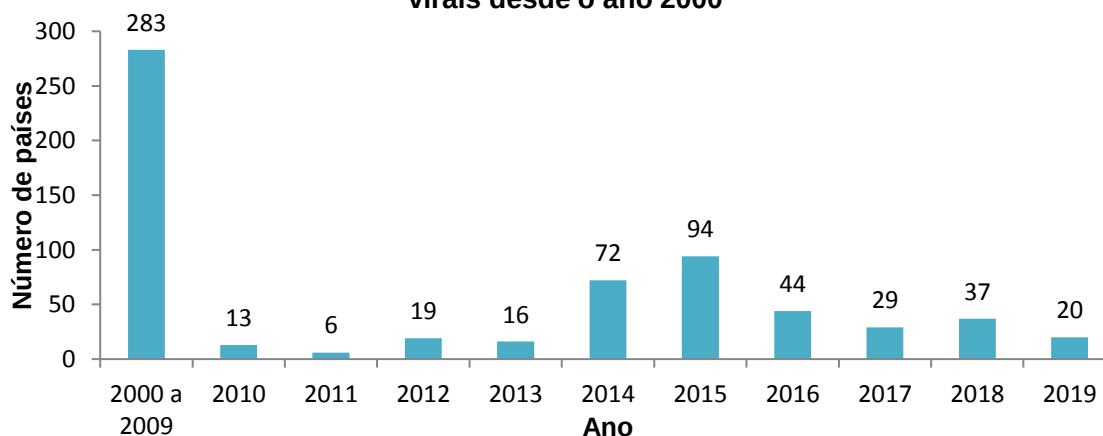
Número total de países que adicionaram algumas vacinas anti-virais desde o ano 2000

Figura 31 – Número total de países que introduziram algumas vacinas anti-virais entre 2000 e 2019 de acordo com a base de dados da WHO – As vacinas são: RCV, Rotavírus, Hepatite B, Encefalite japonesa, Febre-amarela

Entre o ano 2000 e 2009 houve 283 introduções de vacinas anti-virais, entre as que foram mencionadas anteriormente, a nível global (figura 31). O esperado nos resultados obtidos seria que as vacinas anti-virais fossem introduzidas mundialmente, após a sua comercialização. Deste modo, esperava-se ver um decréscimo no número de introduções de vacinas ao longo dos anos, mas não foi isso que se verificou na figura 30.

A vacinação contra o Rotavírus, continua a ser bastante inferior do que se deveria esperar, visto que ainda há registo de muitas mortes provocadas por diarreia nos bebés, a percentagem de vacinação contra o rotavírus devia de ser muito maior ao longo dos anos.

A vacina contra o rotavírus foi aprovada pelos EUA em 2006. Existe, atualmente quatro vacinas: Rotarix®, Rotateq®, Rotasiil® e Rotavac®. As mais utilizadas são a Rotarix® e a Rotateq®, pois demonstram uma boa eficácia contra infeções pelo rotavírus em ensaios clínicos (Vanderslott, Dadonait, & Roser, 2019). Em 2014, foi aprovado que a partir de 1 de Julho de 2014, bebés com menos de 15 semanas serão elegíveis para a vacinação gratuita contra o vírus, com a vacina Rotateq®, mas não foi aplicado em todos os países (Vanderslott et al., 2019), mas como se pode verificar na figura 30, nesse ano houve um aumento do número de países a introduzir a vacina. Entre 2008 e 2016, a introdução da vacina contra o rotavírus reduziu em 40% o número de internações hospitalares relacionadas à diarreia, segundo a WHO. As taxas de imunização ainda são muito baixas. Os principais fatores pela introdução da vacina são os encargos das doenças diarreicas, a disponibilidade financeira e um clima favorável político às vacinas. Esta vacina é apenas administrada a crianças, mas a cobertura global ainda é muito baixa. Estima-se que apenas 39% das crianças menores de um ano de idade foram vacinadas em 2019 (figura 32) (Vanderslott et al., 2019).

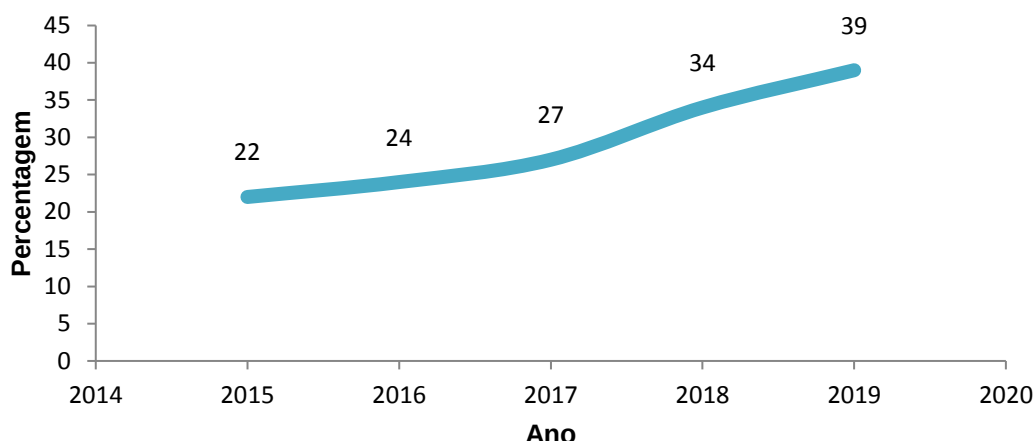
Percentagem de crianças vacinadas contra Rotavírus globalmente entre 2015 e 2019

Figura 32 – Percentagem de crianças vacinadas contra o Rotavírus entre 2014 e 2020 globalmente - Vanderslott et al., (2019).

A principal razão pela qual a vacina não foi já introduzida em mais países prende-se com o facto de a doença não provocar muitas mortes em países desenvolvidos e o custo da vacina poder ser elevado, pois na maior parte dos países não entra no Plano Nacional de Vacinação (PNV). Em Portugal, no ano 2020 a vacina do Rotavírus vai ser implementada no PNV, mas apenas abrange os grupos de risco, que ainda estão por definir em Norma da Direção Geral da Saúde (Despacho n.º 12434/2019 do Ministério Da Saúde, 2019).

Em relação à Hepatite B, é uma infeção viral que ataca o fígado e pode causar doenças agudas e crónicas. É um grande problema de saúde global e é o tipo mais grave de hepatite viral. Estima-se que cerca de 780.000 pessoas morrem a cada ano devido a consequências da hepatite B, como cirrose hepática e cancro de fígado. O vírus é muito contagioso e transmissível, através de contato com sangue ou outros fluidos. A WHO recomenda que todas as crianças recebam a primeira dose da vacina o mais rápido possível após o nascimento. A dose de nascimento deve ser seguida de 2 ou 3 doses para completar a série primária. Não há necessidade de uma dose de reforço da vacina, visto que a proteção dura pelo menos 20 anos e é possível durar a vida toda. Avaliando os resultados obtidos, a recolha de dados foi acerca da vacina monovalente VHB, não houve muitos países a introduzir a vacina, desde 2009 a vacina foi introduzida em 103 países, porque a grande maioria já a introduziu antes do ano 2000, visto ser uma doença com muitos anos e uma vacina existente à muitos anos em Portugal foi introduzida em 1993, por outro lado é possível verificar que ainda houve 3 países a introduzirem a vacina em 2019, Japão, Noruega e Reino Unido. A vacina já era administrada nestes países, mas não fazia parte do plano de vacinação. Contudo, as

taxas de vacinação diferem de país para país principalmente devido a problemas de armazenamento, acessibilidade, prioridades e conscientização geral. Em Julho de 2019 a WHO anunciou que 189 países fornecem a vacina para bebés a nível nacional mas a cobertura global da dose de nascimento é de apenas 42%. Em alguns países a vacina pentavalente é oferecida, esta vacina protege contra cinco doenças, incluindo a hepatite B. No entanto não pode ser administrada até que o bebé tenha pelo menos 6 semanas de vida, o que deixa uma lacuna na proteção do bebé. A *Global Health Sector Strategy* (GHSS) tem como meta, através de intervenções específicas, quer que em 2020 e 2030 90% da população mundial esteja vacinada contra a hepatite B (*Global hepatitis report, WHO, 2017*).

No caso da Poliomielite, estima-se que em 1990 existiam 23.390 pessoas infetadas com a doença, número que veio a diminuir ao longo dos anos com o aumento da percentagem de pessoas vacinadas. Em 1990 estima-se que em todo o mundo 75% das pessoas teriam sido vacinadas. Claro que para além do aumento do número de pessoas vacinadas, também houve cada vez mais sensibilização e conhecimento acerca das doenças, o que ajudou na sua prevenção. A vacina que foi aqui estudada é a IPV que é dada por injeção e na qual o vírus está inativo. Como se pode verificar, nos anos 2014 a 2018 houve uma maior introdução da vacina comparativamente com os restantes anos porque houve um grande e constante incentivo da vacinação contra a poliomielite em crianças durante esta altura. No ano 2020 África ficou livre da poliomielite, ou seja, a WHO declarou que a poliomielite foi erradicada no continente após 4 anos sem nenhum caso na Nigéria. Agora apenas o Afeganistão e o Paquistão ainda têm o vírus a circular na população. Caso se consiga erradicar a doença nestes dois países, esta será a segunda doença a ser erradicada no mundo, depois da varíola. Isto só mostra o poder e a importância da vacinação.

O vírus da encefalite japonesa (JEV) é um flavivírus, está relacionado aos vírus da dengue, febre-amarela e Nilo ocidental, e é transmitido por mosquitos. A maioria das infeções são assintomáticas mas os casos clínicos tendem a se manifestar como encefalite grave e a maioria dos sobreviventes apresentam sequelas neurológica. Nos últimos 50 anos o JEV tem-se expandido gradualmente pela Ásia e em algumas partes da região do Pacífico Ocidental (Campbell et al., 2011). Os casos reportados anualmente são nas regiões tropicais da Ásia, incluindo países como o Japão, China, Filipinas, Coreia, Taiwan, Índia e todos os países do Sudoeste Asiático. Os países com epidemias comprovadas são a Índia, Paquistão, Birmânia, Laos, Sri Lanka, Malásia, Vietname, Indonésia, Singapura, e Filipinas. A infeção é na maioria das vezes é assintomática, mas pode provocar alguns sintomas como febre, mialgia, congestão nasal, diarreia e vômitos. Ainda não existe tratamento, logo a vacina é essencial para a

gestão da doença, tanto nos residentes em áreas afetadas como em viajantes (Solomon et al., 2000).

Como se pode verificar na figura 30, é uma vacina que ao longo dos anos foi adicionada em poucos países, pois não se justifica em alguns ter a proteção contra este vírus visto que nem sequer há registo de doenças nesses mesmos países. Mas é de maior importância a vacinação após consulta do viajante para uma proteção individual contra a doença quando se viaja para os países atrás mencionados. A Singapura tomou a decisão de não introduzir a vacina contra a encefalite japonesa porque afirma que o número de casos em humanos é esporádico e raro. Indonésia, que adicionou a vacina em 2018 é apenas restringida no Bali.

Conseguimos ter uma ideia das áreas de risco de transmissão do vírus da encefalite japonesa e onde as vacinas foram introduzidas nos últimos anos (figura 33).

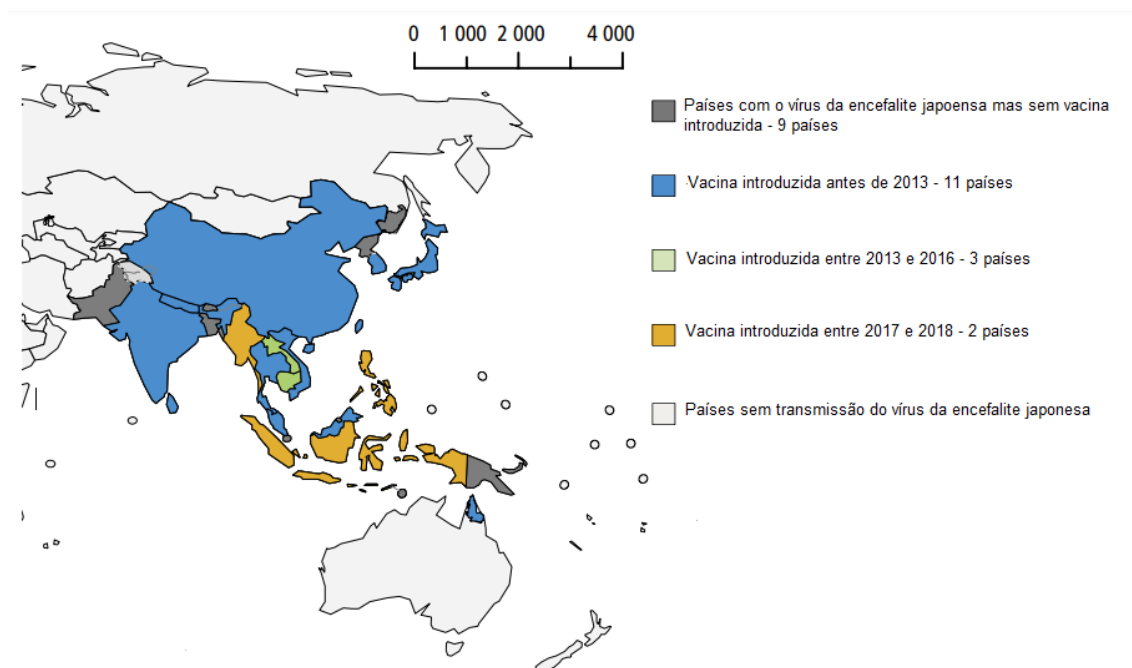


Figura 33 – Áreas de risco de transmissão do vírus da encefalite japonesa e introdução de vacina. Figura adaptada de: “Relatório epidemiológico Semanal – WHO”, Heffelfinger, J. (2017).

A febre-amarela pertence à família *Flaviviridae* e do género *Flavivirus* do grupo IV. É transmitida pela picada do mosquito do género *Aedes* ou *Haemagogus*. A cada ano a febre-amarela provoca em média 200.000 infeções e 30.000 mortes, sendo a maioria no continente africano. A febre-amarela continua a aparecer em alguns países recentemente tais como em África (Mali), Brasil, Nigéria e Uganda. Outros países de

alto risco são a Etiópia, Sudão e Uganda. A transmissão do vírus ainda é muito difícil de se prever. Os países de alto risco estão a tomar medidas para a introdução da vacina. Em 2019 o Sudão recebeu o apoio da GAVI, que mais à frente será explicado melhor o objetivo deste grupo, para a introdução da vacina contra a febre-amarela. Existem também a Estratégia Eliminar Epidemias de Febre-amarela (EYE) que foi lançada em 2017 que apoia 40 países em risco em África e nas Américas para prevenir a disseminação da doença e conter surtos. Até 2026 esperam que mais de 1 mil milhão de pessoa estejam protegidas contra a doença (Heffelfinger, 2020).

Como se pode verificar na figura 30, houve 27 países que introduziram a vacina entre 2000 e 2009, houve um ou dois países que introduziram em cada ano entre 2010 e 2013 mas depois durante 3 anos nenhum adicionou a vacina. Com a introdução da GAVI em 2017, a partir desse ano até 2019, 6 países já introduziram a vacina no seu plano de vacinação, mas nenhum deles faz parte dos principais países de grupo de risco, visto que a maioria dos grupos de risco são países com baixos rendimentos económicos e com dificuldades no armazenamento das vacinas.

Por último, temos os dados da vacina contra a Papeira, Sarampo e Rubéola. Falando um pouco de cada doença, o vírus do sarampo pertence à família *Paramyxoviridae* e do género *Morbilivirus*. É uma doença altamente contagiosa, que pode até levar à morte. Em 2018, apesar das campanhas de vacinação e do facto de a vacina ser segura e económica, morreram mais de 140.000 pessoas em 2018, a maioria crianças com idade inferior a 5 anos. Até ao final de 2018, 86% das crianças haviam recebido uma dose da vacina contra o sarampo aos dois anos de idade, e em 171 países haviam incluído uma segunda dose da vacina como imunização de rotina. 69% das crianças receberam duas doses da vacina, de acordo com os planos de imunização.

A papeira, que tal como o sarampo, também é altamente contagiosa. O vírus pertence à família *Paramyxoviridae*. A doença raramente traz consequências graves em crianças, pode causar meningite ou encefalite mas é raro. Nos adultos pode surgir alguma complicação mais grave, como uma infeção no testículo mas raramente provoca infertilidade. A partir de 1960 começaram a aparecer vacinas eficazes contra a papeira. A rubéola é uma doença viral contagiosa que geralmente tem sintomas leves nas crianças. Pertence à família *Togaviridae* e ao género *Rubivirus*. Os casos notificados de rubéola diminuíram 97%, de 670.894 casos em 102 países no ano 2000 para 14.621 casos em 151 países em 2018. Em 2012 começou uma iniciativa contra o sarampo, lançada pelo plano estratégico global do sarampo e da rubéola, que cobria o período entre 2012 e 2020, com várias metas, entre elas a eliminação do sarampo e da rubéola em pelo menos 5 regiões da WHO. A vacina RCV que tem a proteção contra os três vírus, tem uma grande adesão, como se pode verificar na figura 30, entre o ano 2000 e

2009 a vacina foi adicionada ao plano de vacinação de 128 países, e no ano 2017 ainda houve 15 países que adicionaram a vacina ao plano de vacinação. Apesar de continuar a haver países sem a introdução da vacina no plano de vacinação, esta vacina tem uma grande adesão a nível mundial.

Fora do estudo da WHO, também foi avaliada a introdução da vacina contra o HPV, que é bastante relevante no contexto atual da vacinação. Desde Junho de 2006 a Outubro de 2014, 80 países/territórios implementaram programas de imunização contra o HPV. A idade mais frequente a quem foram administradas é de 12 anos de idade. Estima-se que 47 milhões de mulheres de todo o mundo foram vacinadas contra o HPV (figura 34), sendo administrado todas as doses corretas no tempo correto (Bruni et al., 2016). Podemos ver a número de mulheres vacinadas de 2006 a 2014, por continentes, por países e o ano de implementação da vacina, e conseguimos perceber que ao longo dos anos a percentagem de mulheres vacinadas tem sido cada vez maior e também o número de países que têm introduzindo a vacina ao longo dos anos (figura 35).

Número de mulheres vacinadas globalmente com vacina contra HPV (milhões)

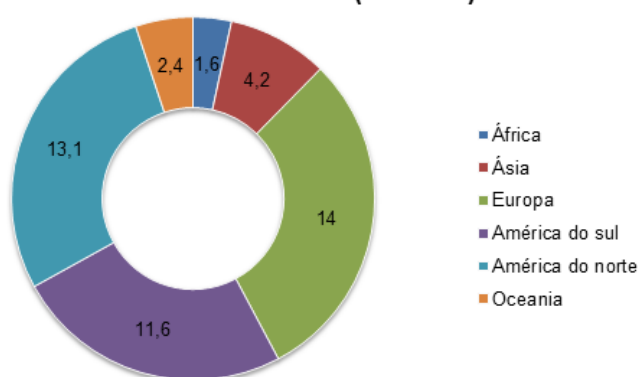


Figura 34 – Número de mulheres vacinadas contra HPV de 2006 até 2014, cumprindo todas as doses da vacina globalmente - Bruni et al.,(2016).

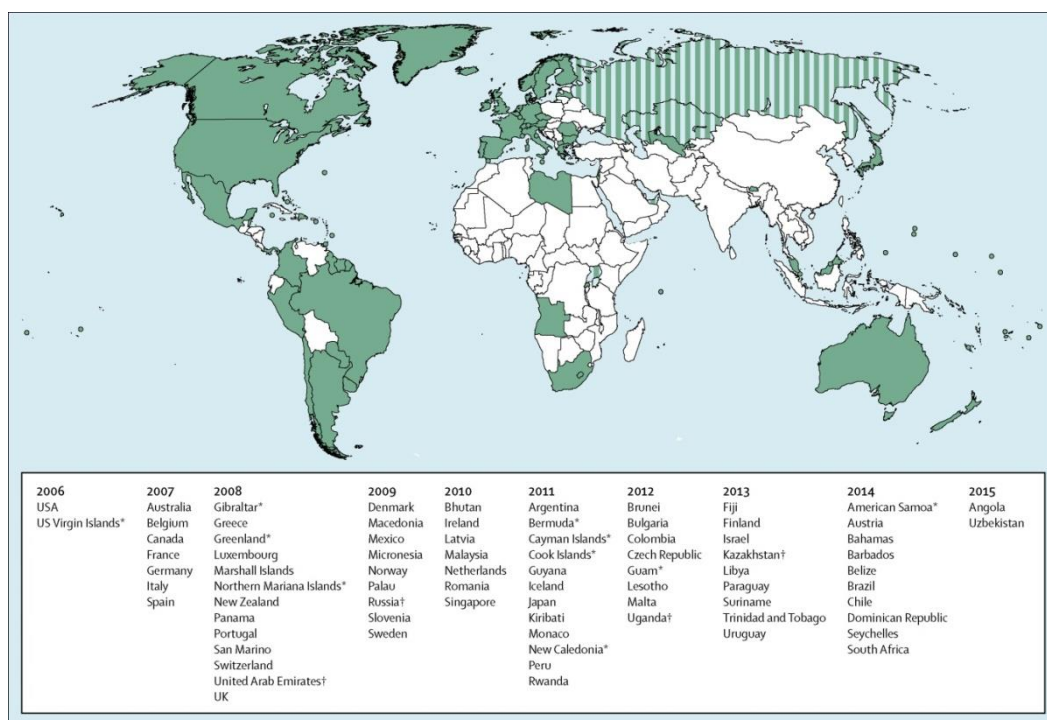


Figura 35 – Países que introduziram no programa nacional de vacinação a vacina contra o HPV desde 2006, por ano. Fonte: Bruni et al., (2016).

Em Portugal, a partir de 2020, vão alargar a vacinação contra HPV ao sexo masculino até aos 10 anos de idade (Despacho n.º 12434/2019 do Ministério Da Saúde, 2019), ou seja vai passar a estar incluída no PNV a crianças até 10 anos de idade. Apesar de não ser um grupo de risco, há o risco de futuramente poderem transmitir o vírus ao sexo feminino.

Existe uma parceria com o objetivo de salvar vidas de crianças e proteger a saúde da população humana melhorando o acesso à imunização em países pobres, chamada de GAVI Alliance. A aliança une os governos de países em desenvolvimento. Desde do ano 2000 que a GAVI distribui vacinas nas áreas mais pobres do mundo pelas crianças. De 2000 a 2010 a GAVI contribuiu à imunização de 288 milhões de crianças contra doenças mortais, e deste modo, segundo a OMS, em 2010 estimou que a GAVI impediu mais de 5 milhões de mortes futuras (Paris, 2013).

Entre janeiro de 2010 a dezembro de 2015, 108 dos 138 países de baixa e média rendimentos adicionaram pelo menos uma vacina nova e subutilizada ao seu programa nacional de imunização e uso sustentado da vacina por pelo menos 12 meses, ou seja, até dezembro de 2015. Essas vacinas incluem: vacina contra rotavírus, vacina contra papiloma vírus humano, rubéola e encefalite japonesa. Esses 108 países representam

mais de 70% da população mundial que vive em países de rendimentos baixa e média (tabela 5) (Paris, 2013).

Tabela 5 - Número de Estados-Membros de baixa e médio rendimento que introduziram uma vacina nova e subutilizada entre janeiro de 2010 e dezembro de 2015 e mantiveram seu uso por pelo menos 12 meses, por elegibilidade da vacina e GAVI. Tabela adaptada de: Paris, (2013) .

Classificação do país	Total de países na categoria	Estados-Membros que introduziram pelo menos uma vacina	Vacinas			
			Rotavírus	HPV	Rubéola	Encefalite Japonesa
Países elegíveis para apoio GAVI	73	66 (90%)	35	3	15	4
Países de rendimento médio, sem apoio do GAVI	65	42 (65%)	13	17	4	0
Total	138	108 (78%)	48	20	19	4

Como se pode observar na tabela 5, quarenta e dois destes países de baixa e médio rendimento introduziram uma vacina entre 2010 a 2015, enquanto que 65 países (45 dos quais são de rendimentos médios elegíveis ao apoio Gavi e 20 não) introduziram mais do que uma vacina. Ocorreu, num total de 194, introduções de vacinas nestes 108 países de rendimentos baixos e médios durante os primeiros seis anos da Década de Vacinas. Um aumento nas introduções de vacinas novas e subutilizadas nos últimos anos foi observado, 35% dos países de baixo e médio rendimento introduziram vacinas contra rotavírus entre 2010 e 2015. Durante o mesmo período, 19 países de rendimento baixo e médio introduziram e sustentaram a vacina contra a rubéola e 20 introduziram e sustentaram o uso do HPV até 2015. Espera-se que o número de países de baixo e médio rendimento que introduzam o HPV aumente devido à política de GAVI que apoia a introdução rotineira do HPV (Paris, 2013).

Foram calculadas o número de mortes evitadas durante o período de 2011 a 2020, num cenário de não vacinação. Apenas com a 1ª dose da vacina do sarampo

conseguiu se evitar cerca de 10,6M de mortes entre 2011 e 2020 (figura 36). No total foram evitadas entre cerca de 21,7M de mortes por não vacinação (Asselin et al., 2013).

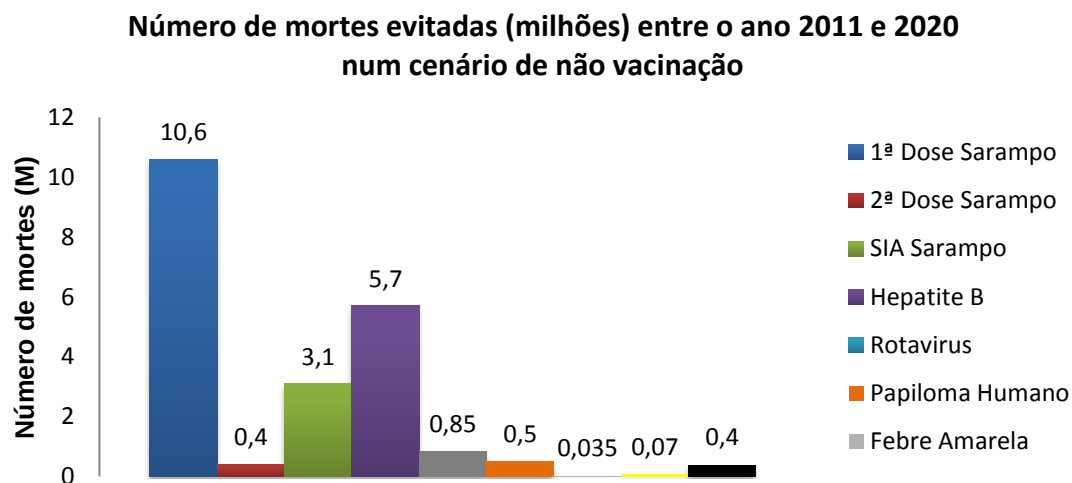


Figura 36 – Número de mortes evitadas (milhões) entre o ano 2011 e 2020 num cenário de não vacinação, após a vacinação das vacinas anti-virais contra o Sarampo (1ª e 2ª dose), Hepatite B, Rotavírus, Papiloma Humano, Febre-amarela e uma campanha de vacinação em África contra Sarampo com a 1ª e 2ª dose da vacina contra o Sarampo. Fonte: Asselin et al. (2013).

4. VACINAS ANTIVIRAIS EM DESENVOLVIMENTO E EM ENSAIOS CLÍNICOS NOS ÚLTIMOS 5 ANOS

Vacinas promissoras contra a Ébola

Desde 1 de Agosto de 2018 a 25 de Março de 2019, foram confirmados 951 casos prováveis de doença pelo vírus da Ébola. Existem alguns candidatos a vacinas e terapêuticas, mas o trajeto tem sido complicado. O seu desenvolvimento e licenciamento não tem despertado o mesmo interesse por parte das empresas farmacêuticas como o têm o HIV ou a malária, uma vez que para estes últimos existem milhares de casos todos os anos. Para além disso, o vírus circula num continente onde a maioria da população não tem capacidade financeira para comprar medicação/vacinas (Banadyga & Marzi, 2017).

O EBOV é considerado a espécie mais letal do género. Em surtos humanos tem uma letalidade de 60 a 90%. O facto de não haver ajudas a nível financeiro, mercado comercial limitado e uma falta de compreensão da imunidade dificultaram o projeto de uma vacina contra o filovírus (Suschak & Schmaljohn, 2019).

O rVSV-ZEBOV é o candidato a vacina mais próximo da de uma vacina capaz de combater o surto do vírus da Ébola (Ehrhardt et al., 2019). A eficácia desta vacina foi demonstrada em 2015, na Guiné, em que foi usado um ensaio randomizado com um grupo vacinado em “vacinação em anel”. Esta estratégia consiste na vacinação de pessoas que estiveram em contato direto com pelo menos um caso confirmado de ébola e pessoas que estiveram em contato com essas pessoas (Merler et al., 2016).

Perfis imunológicos recolhidos de sobreviventes de vários surtos de filovírus propõem que há um desenvolvimento precoce de anticorpos IgM anti-EBOV seguido pelo desenvolvimento de IgG anti-EBOV, enquanto que os não sobreviventes frequentemente não desenvolvem respostas IgG (Suschak & Schmaljohn, 2019). Estudos também demonstraram que os sobreviventes de EBOV tinham níveis altos de células T IFN- γ + e TNF- α + CD4 + e CD8 + após a exposição (Suschak & Schmaljohn, 2019).

Podemos afirmar que cada espécie de filovírus pode apresentar um desafio na criação de uma vacina, será então necessária uma vacina multiespécie para proteger contra cada espécie antigenicamente distinta da família dos filovírus.

- Vacinas inativadas contra vírus e vacinas de proteínas de subunidade

Por norma, a primeira opção de vacina explorada contra doenças infecciosas é a vacina de vírus inativada (Suschak & Schmaljohn, 2019). Recentes desenvolvimentos

levaram a tentativas de criação de novos métodos para criar vacinas de filovírus inativados – viriões de EBOV inativados por tratamento com agente alquilante fotoinducível iodonaftilazida (AFI). A inativação por AFI produziu viriões que eram morfollogicamente idênticos ao vírus vivo. Num estudo em ratos vacinados com esta vacina, foram protegidos 80%, talvez pela obtenção de anticorpos específicos para o EBOV e células T CD8+. Contudo, a mesma eficácia não foi observada em primatas não humanos (NHP's). A vacinação com partículas de EBOV irradiadas com radiação gama fez com que todos os NHP's se seroconvertessem e desenvolvessem anticorpos neutralizantes (Suschak & Schmaljohn, 2019).

Outros estudos que envolveram uma vacina EBOV trivalente composta por GP recombinante, VP24 e VP40 provaram que podem alcançar uma proteção completa em camundongos. Para além desta descoberta, avanços recentes que permitem a fusão de domínios extracelulares de EBOV ao fragmento Fc da imunoglobulina humana têm-se demonstrado mais imunogénicos. Se administrarmos juntamente com *Poly-ICLC*, complexo sintético que estimula a libertação de citocinas, (Saxena et al., 2019) a vacina demonstrou proteger por completo as cobaias, contra o EBOV. Estes resultados sugerem que as vacinas de subunidades recombinantes podem ser uma maneira de obter imunidade contra a infeção por filovírus mas tem que haver mais estudo em animais, como por exemplo os NHP's (Suschak & Schmaljohn, 2019).

- Vírus da estomatite vesicular como veículo de vacina

O vírus da estomatite vesicular recombinante (rVEV) é um vírus de RNA, de cadeia negativa da família *Rhabdoviridae*. O seu genoma consegue codificar 5 proteínas: a proteína G (a proteína grande), fosfoproteína, proteína da matriz e a nucleoproteína. A proteína VEV-G é expressa na superfície do virião e permite a entrada viral (Regules et al., 2017). Tornou-se um vetor ideal de vacina devido à facilidade com que o vetor VEV pode ser cultivado em *in vitro* e *in vivo*. Este também demonstrou ser um potente indutor de respostas imunes inatas e adaptativas, o que motivaram para a criação do vetor rVEV. Devido ao surto de EBOV em África em 2013, houve uma necessidade de ensaios clínicos de fase I a fase III, na tentativa de desenvolver métodos eficazes. Os dois primeiros ensaios de fase I basearam-se no aumento de dose da vacina, realizado dos EUA, para testar a segurança e imunogenicidade de uma dose única ou de duas doses idênticas de VEV-EBOV (NCT02269423 e NCT02280408). Os vacinados receberam 3×10^6 , 2×10^7 ou 1×10^8 UFP (unidades formadoras de placas). Apenas foram detetados pequenos efeitos adversos, tais como cefaleia, mialgia, febre e calafrios, mas desapareceram 4 dias após a vacinação. As doses de 2×10^7 e 1×10^8 UFP geraram níveis mais altos de anticorpos específicos para o EBOV GP, medido por

ELISA e ensaio de neutralização. Contudo, o aumento da dose não proporcionou uma melhoria significativa na imunogenicidade da vacina. Com este estudo conseguiu-se concluir que a IgM contribuiu substancialmente para a neutralização do vírus e identificou-se novos epítomos de EBOV GP (Suschak & Schmaljohn, 2019).

Em simultâneo com os estudos nos EUA, também se realizaram estudos de fase I na Europa (Hamburgo, Alemanha, Genebra e Suíça) e África (Lambaréné, Gabão, Kilidi e Quénia). As doses administradas foram variando de 3×10^5 a 5×10^7 UFP da vacina VEV-EBOV ou placebo. Tal como os estudos realizados nos EUA, os resultados dos estudos na Europa e em África demonstraram uma boa imunogenicidade e foram desenvolvidos anticorpos neutralizantes com apenas uma vacina. Contudo, em Genebra, 11 dos 51 participantes desenvolveram artrite após 2 semanas da administração da vacina. Desses 11 pacientes, 8 receberam uma dose de 1×10^7 UFP e 3 receberam 5×10^7 UFP. Devido aos resultados, leva-nos a sugerir que uma dose mais baixa da vacina pode ser necessária para evitar efeitos adversos sistémicos. Então decidiram adicionar uma nova dose, 3×10^5 UFP, uma dose mais baixa para comparar segurança e imunogenicidade. Os pacientes vacinados com a dose mais baixa de VEV-EBOV tiveram níveis significativamente baixos de IgG específica para o EBOV. Como pontos positivos, 36% dos pacientes vacinados desenvolveram imunidade celular específica para VEV-N (proteína do núcleo), e 28% dos pacientes vacinados desenvolveram anticorpos específicos para VEV-M (proteína da matriz). Mais tarde, descobriram que CCL2, CCL4, IL-6, TNF- α , IL-1R α e IL-10 estavam relacionados com o desenvolvimento de artrite nos vacinados.

Em 2015, foram iniciados 3 ensaios clínicos de fase III para a vacina VEV-EBOV. O primeiro ensaio foi feito na Guiné, e usaram o método de vacinação em anel aberto e controlado por *cluster*. Então os contactos e contactos de contactos de pacientes positivos para EBOV foram separados em dois grupos e vacinados com uma dose única de 2×10^7 UFP VEV-EBOV para provocar rapidamente uma imunidade protetora contra o EBOV. Devido aos bons resultados do estudo, foi possível afirmar que a estratégia de vacinação em anel pode ser eficaz durante surtos de EBOV mas idealmente deve-se administrar imediatamente a vacina (Suschak & Schmaljohn, 2019).

Em Dezembro de 2016, na Serra Leoa, deu-se como terminado um ensaio clínico de fase II/III. Dos 8.000 participantes, 64 desenvolveram sintomas idênticos aos provocados por EBOV mas nenhum caso foi confirmado após análises laboratoriais.

Em 2015, iniciou-se na Espanha e Canadá um ensaio clínico de fase III. Um estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego, com um total de 1197 participantes. O objetivo foi avaliar a segurança e imunogenicidade de 3 lotes com a dose de 2×10^7 UFP

chamado lotes de consciência e um lote com a dose de 1×10^8 UFP, chamado lote de doses altas. A vacina foi bem tolerada sem nenhum relato de efeitos adversos graves, apenas efeitos adversos menores (Suschak & Schmaljohn, 2019).

Por fim, na Libéria, recentemente foi iniciado um ensaio clínico de fase II, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, para comparar a vacina ChAd3.EBOV, que é uma vacina já utilizada e comercializada, e a vacina VEV-EBOV com um placebo (NCT02344407). Ambas provaram ser imunogênicas, em que 63,5% pacientes vacinados com a vacina ChAd3.EBOV e 79,5% dos pacientes vacinados contra VEV-EBOV ainda tinham anticorpos específicos 12 meses após a vacinação. Ambas vacinas foram bem toleradas. Os resultados do NCT02344407 podem ser confirmados num estudo de fase II que está atualmente em andamento.

Portanto, existem várias de vacinas em fase I e fase II nos ensaios clínicos e que devido aos bons resultados de segurança e de eficácia levou ao início do primeiro ensaio clínico de fase III da vacina EBOV. Contudo existem ainda muitos desafios por ultrapassar, sendo um deles o licenciamento de uma vacina que pode ser fabricada e implementada rapidamente durante um ambiente de surto. A vacina VEV-EBOV demonstrou eficácia em estudo clínicos de fase III, mas as preocupações incidem sobre a durabilidade da imunidade a longo prazo provocada pela vacina, pois alguns estudos demonstraram que as respostas ao antiEBOV podem desaparecer num espaço de meses (Suschak & Schmaljohn, 2019).

- Vírus parainfluenza humano tipo 3 (HPIV3) como veículo de vacina

Os vírus da parainfluenza são paramixovírus, e são classificados como tipos 1, 2, 3 e 4. Este vírus pode causar infecções repentinas (Tesini, 2018). O HPIV3 é um vírus de RNA da família *Paramyxoviridae*, que provoca doenças respiratórias principalmente a crianças. Quando usado como vetor, tem a capacidade de induzir respostas imunológicas sistêmicas, no trato respiratório (Lewandowska-Polak et al., 2015). Um grupo de cientistas inseriu inicialmente um segmento de transcrição expressando o EBOV GP e EBOV NP no HPIV3. Com uma única administração intranasa/intratraqueal combinada, é imunogênica em macacos verdes africanos, e forneceu 88% de proteção no macaco Rhesus. Conseguiu-se atingir os 100% de eficácia protectora com uma segunda dose de HPIV3/EBOV GP. Foi possível observar que a administração em aerossol de HPIV3/EBOV GP induziu altos níveis de imunidade sistêmica e de imunidade da mucosa. Foram medidos altos níveis de IgG e IgA em macacos Rhesus vacinados e foi relatado a presença de células T CD8+ específicas para o antígeno no pulmão. Apesar dos resultados prometedores de eficácia da vacina, não foi possível a transição da vacina HPIV3/EBOV para humanos. Com isto, foi gerado num novo vetor

HPIV3 atenuado, em que os genes F e HN foram removidos, fazendo com que este novo vetor atenuado fosse mais imunogénico comparativamente com o inicial, induzindo 6,4 vezes mais o anti-GP. Recentemente foi realizado um estudo nos EUA, de Fase I para avaliar a segurança, infecciosidade e imunogenicidade da vacina HPIV3/EBOV administrada via intranasal (NCT02564575). Os resultados desta ainda não foram divulgados (Suschak & Schmaljohn, 2019).

Vacinas intradérmicas

A administração de vacinas intradérmicas mostrou-se capaz de desencadear respostas imunes a nível sistémico, em que o antígeno é administrado através da pele usando-se dispositivos auto-administráveis desenvolvidos recentemente. Um deles em particular é a tecnologia de microagulhas, que tem a capacidade de penetrar a barreira de permeação cutânea imposta pelo estrato córneo e facilita a libertação dos antígenos. A eficácia deste tipo de administração deve-se à presença de vários tipos de células imunes no epitélio, como linfócitos T, células NK, macrófagos e mastócitos (Criscuolo et al., 2019). Mas as células responsáveis por desencadear a cascata de inflamação na pele são as células de Langerhans, que formam cerca de 2 a 4% das células epiteliais. As células de Langerhans são células apresentadoras de antígenos, portanto têm como função identificar, processar e apresentar os antígenos neoformados das células tumorais ao sistema imunitário (I. Santos, De Mello, Dos Santos, & Dos Santos, 2010). Estas células também são estimuladas por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) usando uma variedade de recetores de reconhecimento de padrões codificados por linha germinativa (PRR) incluindo os recetores *toll-like* (TLR) e langerina (CD207) (Criscuolo et al., 2019).

A imunização intradérmica é uma estratégia futura que mostra vantagens significativas sobre a vacinação convencional. Nos últimos anos, a vacinação intradérmica ganhou impulso como uma via alternativa e mais eficaz de administração de vacinas, tanto no ponto de vista comercial como científico. Podemos ver algumas vacinas intradérmicas em desenvolvimento, contra a Influenza A e B, Hepatite B, Dengue e Poliomielite (tabela 6).

Tabela 6 – Desenvolvimento de algumas vacinas intradérmicas. Tabela adaptada de: Criscuolo et al. (2019)

Agente patogénico	Formulação/ Antigénio	Indicação	Estado do ensaio clínico	ID do ensaio clínico
Vírus da Gripe	Vírus Dividido (<i>split virus</i>)	Influenza A e B	Aprovado	NCT01712984 NCT02563093 NCT02258334 NCT01946438
HBV	HBsAg	Hepatite B	Fase I	NCT02186977
Vírus do Dengue	Vírus atenuado	Dengue	Fase I	NCT01765426
Poliovírus	Vírus inativo	Poliomielite	Fase 3	NCT03239496

A técnica de imunização intradérmica padrão foi inventada pelo médico francês Charles Mantoux em 1910 enquanto desenvolvia o teste da tuberculina. Os avanços recentes levaram ao desenvolvimento de técnicas e instrumentos que podem superar as dificuldades associadas à administração intradérmica (I. Santos et al., 2010). Vários dispositivos foram desenvolvidos ao longo dos anos, entre eles, as microagulhas sólidas, injetores de partículas e adesivos auto-administráveis com microprojeções revestidas ou agulhas biodegradáveis.

Este tipo de vacinação demonstrou ser muito seguro. Outro aspeto positivo é a possibilidade de melhorar a imunogenicidade de várias vacinas em hospedeiros imunocomprometidos (Criscuolo et al., 2019).

Vacina para o SARS-CoV-2

Este novo coronavírus, responsável pela doença COVID-19, que foi identificado pela primeira vez em Dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, na China, nunca tinha sido previamente identificado em seres humanos. Segundo a OMS, em Maio de 2020, registou-se 5,2 milhões de infeções e mais de 337 mil mortes, a nível global. Este vírus pertence ao género Betacoronavírus, que está relacionado ao coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e com vários coronavírus de morcego (Wang et al., 2020). Desde a sua identificação, mais de 90 vacinas estão a ser desenvolvidas

(figura 37). Algumas destas já começaram a ser administradas em voluntários em testes de segurança e outros em animais (Callaway, 2020).

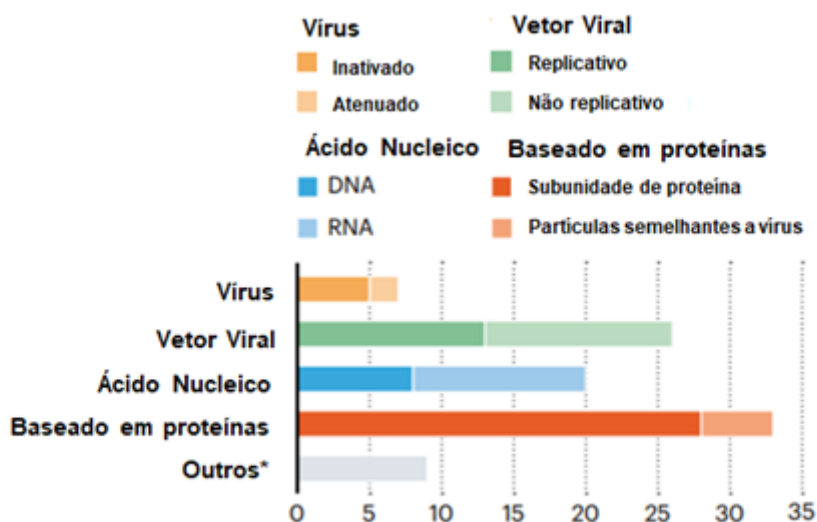


Figura 37 – Tipo de vacinas em desenvolvimento contra SARS-CoV-2 e a sua quantidade.

Figura adaptada de "The Race for Coronavirus Vaccines" Callaway, 2020.

*Outros esforços incluem testar se vacinas existentes contra o poliovírus e a tuberculose podem ajudar a combater o SARS-CoV-2 provocando uma resposta imune geral (em vez de específica).

Como podemos observar na figura 37, pelo menos 25 equipas estão a tentar desenvolver uma vacina de vetores virais, em que pretendem modificar geneticamente o vírus do sarampo ou do adenovírus para produzir proteínas de coronavírus no organismo, dividindo em dois grupos, aqueles que ainda se podem replicar dentro das células e aqueles que não podem porque os seus principais genes foram desativados. Nenhuma vacina licenciada usa o método de vetor viral não replicante, mas a Johnson & Johnson está a tentar desenvolver uma vacina por esta via. Cinco equipas estão a tentar criar uma vacina de VLP, com o objetivo de criar uma resposta imune forte, sem infectar os pacientes, pois não possuem material genético, possuem apenas a estrutura vazia do vírus (Callaway, 2020).

Uma das vacinas a serem desenvolvidas é uma vacina inativada, a BBIBP-CorV, por um grupo de investigadores na China. Para o desenvolvimento desta vacina, isolaram três estirpes, a 19nCoV-CDC-Tan-HB02 (HB02), 19nCoV-CDC-Tan-Strain03 (CQ01) e a 19nCoV-CDC-Tan-Strain4 (QD01), que foram retirados de amostras de pacientes hospitalizados infectados com o novo coronavírus (Wang et al., 2020). Estas estirpes foram isoladas em células Vero. Estas células são uma das aprovadas pela OMS para a produção de vacinas. Estas células são oriundas do rim de macaco-verde

africano (*Cercopithecus aethiops*) (Emanuele, 2014) é livre de agentes patogénicos e é suscetível a diversos vírus, como o Poliovírus e o Parainfluenza tipo 2. Foi descoberta no Japão por Yasumura em 1962 (Agda, 2015). A estirpe HB02 mostrou ser aquela com replicação ideal e gerou maiores rendimentos de vírus nas células Vero comparativamente com as outras estirpes. Com estes resultados foi então escolhida esta estirpe para o desenvolvimento de uma vacina inativada – BBIBP-CorV. Até agora, estudos demonstram que a vacina induziu altos níveis de anticorpos neutralizantes em seis espécies de mamíferos: ratos, camundongos, porquinhos-da-índia, coelhos, macacos cinomolgos e rhesus. A imunização foi dada em duas doses, 2 µg / dose de BBIBP-CorV, que conferiu uma eficiente proteção contra o SARS-CoV-2 em macacos rhesus. Todos os que levaram a vacina, mesmo em doses diferentes, não apresentaram carga viral detetável em qualquer lobo pulmonar 7 dias após a inoculação. Com base nestes resultados, a Fase I está em andamento e um estudo clínico de Fase II foi iniciado (Wang et al., 2020).

5. DISCUSSÃO/CONCLUSÃO

A vacinação é um dos maiores sucessos da área da saúde pública. São indispensáveis para a prevenção de infeções virais. A invenção da prática por variação foi sem dúvida uma das práticas mais importantes, pois levou ao desenvolvimento de outras técnicas para tentar descobrir a cura e/ou prevenção de certas doenças virais. A imunização atinge mais pessoas do que qualquer outro serviço de saúde, tornando-a assim um fator essencial para a cobertura universal de saúde e base dos sistemas de cuidados primários de saúde.

Nos dias de hoje, a vacinação é praticada em todo o mundo para prevenir doenças fatais, mas nem todas as vacinas cobrem a maioria da população. Temos o exemplo da vacina contra o rotavírus. O rotavírus causa principalmente diarreia e é uma das razões que leva ao internamento de crianças. Apesar de não ser uma doença fatal na maioria dos casos, há dados que apontam para as vantagens da sua inserção no PNV. Apenas 35% das crianças foram vacinadas em 2018. Por não ser uma doença fatal, não compensa financeiramente aos países colocá-la no PNV. Depois temos a vacina contra o HPV, que nas mulheres existe uma grande percentagem de vacinação, porque a vacina é comparticipada pelo SNS. Apesar de não ser crítica a infeção nos homens na maioria dos casos, eles são uma potencial fonte de infeção para as mulheres e podem vir a ter problemas de saúde como cancro da garganta provocado pelo vírus, e estes não são vacinados na grande maioria e a vacina não é comparticipada. Em Portugal, a vacina vai ser incluída no PNV para o sexo masculino até aos 10 anos de idade. É uma grande evolução no PNV se formos comparar com os últimos anos.

O sarampo é uma das doenças que foi considerada eliminada em Portugal, mas é importante continuar com a sua vacinação, pois não foi eliminada noutros países, e pode haver assim um contágio proveniente de outra pessoa de outro país.

A poliomielite felizmente é outra doença que está quase a ser erradicada. Em 2020 África ficou livre de poliomielite após 4 anos sem nenhum caso na Nigéria. Apenas o Afeganistão e o Paquistão é que ainda têm casos de infeção pelo vírus, mas caso se consiga a sua erradicação poderá ser a segunda doença a ser erradicada no mundo.

O facto do PNV em Portugal estar em contínua adaptação e dada a excelente adesão por parte do público, os resultados a nível da cobertura vacinal têm sido muito positivos, o que leva a um decréscimo do número de mortes em Portugal por doenças infecciosas. Mas a situação ainda não é a ideal, teremos de implementar mais vacinas gratuitas no PNV de forma a chegar a toda a população ou de tornar os preços muito mais acessíveis à sua compra num cenário de vacinas não comparticipadas pelo SNS.

Ao avaliar a cobertura global, até 2019 houve a introdução da vacina da Hepatite B em 103 países do ano 2000 a 2019, por um lado temos o aspeto positivo, em que foi introduzida em novos países, mas por outro lado, sendo uma vacina que existe há tantos anos, poderia estar inserida em mais países até à atualidade. Assim se vê a desigualdade dos planos de vacinação a nível global. Pode-se afirmar o mesmo para a rubéola, que foi introduzida em 168 países até 2018.

No caso da poliomielite, que estava erradicada em alguns países, a vacinação foi suspensa o que levou a novos casos de poliomielite por vírus importados de outros países, colocando assim novamente todos os países em risco até haver novamente uma erradicação da poliomielite a nível global, o que poderá ainda demorar alguns anos. Portanto a vacinação teve que ser novamente introduzida nesses países. A vacina IPV foi colocada no PNV em 191 países desde o ano 2000 até 2019, felizmente a maioria já tem introduzido esta vacina mais recente.

A vacina ideal seria aquela que fosse altamente imunogénica provocando todos os tipos de resposta com uma pequena dose de antigénio, que fosse eficaz em toda a população de diferentes taxas etárias e estados de saúde, que fosse de baixo custo e de fácil conservação para ser acessível a todo o mundo e assim se obter uma vacinação em massa. Têm-se tentado descobrir novas estratégias de obtenção e produção de vacinas e introdução de novas formas de administração e apresentação de antígenos às células do sistema imunitário. Através da inovação e investigação têm surgido vacinas mais seguras, mais eficazes e polivalentes.

Existem várias vacinas antivirais em desenvolvimento ou em fase de estudos clínicos. Uma das técnicas de administração descritas foi a intradérmica, que tem várias vantagens comparada com a vacinação convencional, é segura e mostra melhorar a imunogenicidade de várias vacinas em hospedeiros imunocomprometidos. Outra via também muito estudada é a via intranasal, que demonstrou altos níveis de imunidade sistémica e imunidade da mucosa. Verificou-se nos resultados do estudo que foram medidos altos níveis de IgG e IgA em macacos Rhesus vacinados contra a parainfluenza, contudo esta eficácia não foi verificada em humanos, mas foi gerado um novo vetor atenuado e que está em fase de estudos e os resultados ainda não foram divulgados. Deste modo podemos esperar a chegada de uma vacina de fácil administração e com uma eficácia superior às vacinas existentes, o que poderá levar a uma maior adesão por parte da população.

Portanto é de extrema importância continuar os financiamentos para o desenvolvimento e ensaios de novas vacinas, a sua divulgação, a sua implementação no PNV de modo a ser acessível a toda a população, que não haja diferenciação entre pessoas com alto, médio ou baixo rendimentos, pois a saúde e o bem-estar é um direito

da humanidade. Como prova disso, também temos o aparecimento do novo coronavírus, o SARS-CoV-2, que se tem mostrado ser altamente contagioso, com sintomas idênticos à pneumonia e que já matou 848.084 pessoas e têm registado 25,334.339 infetados até ao início de Setembro de 2020. Os esforços de criar uma vacina eficaz e segura são muitos, mas infelizmente ainda vai demorar a chegar uma solução que comprove ser segura, mas dada a pandemia, o mais provável é começarem a vacinar a população com a vacina que mostrar melhores resultados até ao final do ano de 2021. Graças à evolução, é possível a criação de uma vacina no espaço de um ano, tal acontecimento era impensável há uns anos atrás ou se não tivesse apostado tanto na ciência e na evolução.

6. PERSPETIVAS FUTURAS

A ambição de 2030 é de salvar pelo menos 1,9 milhões de vidas, evitar 167 milhões de casos e economizar 58 mil milhões USD em 10 anos. O retorno do investimento espera-se que seja 37 vezes mais. Caso os esforços de vacinação não continuem, há o risco de reverter o progresso realizado levando a mais de 2,4 milhões de mortes e um impacto negativo económico de 59 mil milhares de USD (figura 38). Esta ambição irá ajudar os países a alcançar objetivos mais amplos tais como a cobertura universal de saúde e objetivos de desenvolvimento sustentável (*Business case for WHO immunization activities on the African continent*, 2018).

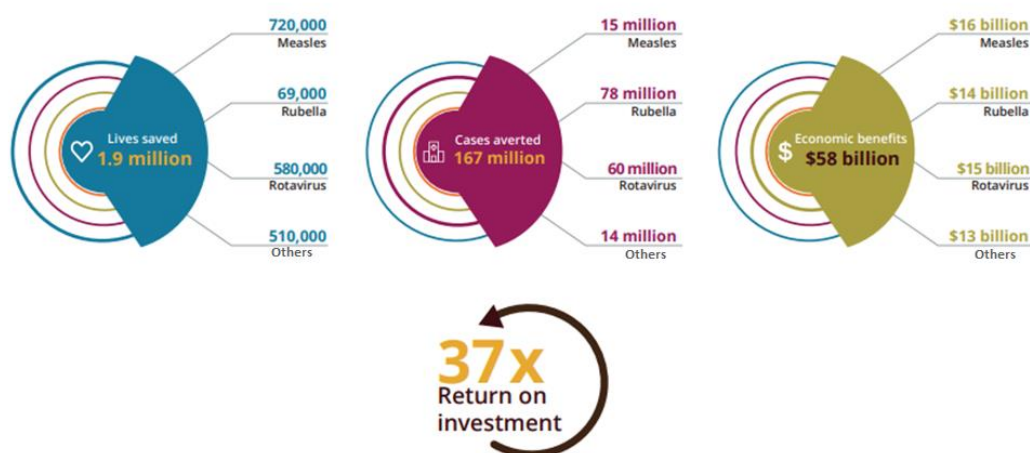


Figura 38 – Vidas salvas, casos evitados e benefícios económicos previstos até ao ano 2030. Figura adaptada de: "*Business case for WHO immunization activities on the African continent*"(2018)

Como objetivos estratégicos a aplicar em todo o mundo, o mais breve possível temos:

- Todos os países devem considerar a imunização como prioridade, devendo haver leis ou uma legislação que garantisse o financiamento para a imunização a nível global;
- Alcançar um mundo livre de poliomielite;
- Cumprir as metas de cobertura da vacinação em todas as regiões, países e comunidades de modo a reduzir a mortalidade, principalmente a mortalidade infantil;
- Desenvolver e introduzir vacinas e tecnologias novas e melhoradas.

Se estes objetivos forem alcançados, milhões de mortes futuras serão evitadas, serão ganhos milhões de dólares em produtividade (Asselin et al., 2013). Mesmo nos países desenvolvidos, o desafio atual é desenvolver programas de vacinação para adultos tão abrangentes e eficazes como o programa das crianças. Para que tal aconteça há a necessidade de implementar novas metas de vacinação bem definidas, tem que haver um plano a nível Mundial, visto que os esquemas de vacinação por norma são homogéneos na EU e tem que haver um financiamento e publicidade por parte das entidades governamentais locais e nacionais. Outro passo importante é haver um maior controlo sobre quem cumpriu ou não o plano de vacinação (Swanson, Schmitt, Jansen, & Anderson, 2015).

A WHO criou uma agenda de imunização 2030. Esta iniciativa tem como objetivo definir uma estratégia e visão global ambiciosa e abrangente para vacinas e imunização para a década de 2021-2030. Entrará em vigor no final do ano de 2020. Baseia-se nas lições da última década e reconhece os desafios contínuos e novos colocados pelas doenças infecciosas como por exemplo o Ébola e COVID-19. Esta estratégia é um mecanismo de desenvolvimento para garantir a responsabilidade de implementação de um monitoramento nos países acerca da vacinação.

Estamos neste momento em plena pandemia causada por um novo coronavírus, que tem mostrado ser altamente contagioso e com uma taxa de mortalidade significativa. Este acontecimento, vem reforçar o quanto é importante apostar no desenvolvimento de novas vacinas e de novas estratégias de vacinação, tanto para prevenção como para tratamento.

7. BIBLIOGRAFIA

- Acheson, N. H. (2011). *Fundamentals of Molecular Virology* (2nd editio). Hoboken: Wiley.
<https://doi.org/10.1002/pauz.200790112>
- Agda, T. (2015). AVALIAÇÃO DE ALTERNATIVAS AO USO DO SORO FETAL BOVINO NA ADAPTAÇÃO DE CULTIVOS CELULARES E OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE CÔRNEA BOVINA (CORBOV). *Universidade Federal de Minas Gerais*.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Aiewsakun, P., & Simmonds, P. (2018). The genomic underpinnings of eukaryotic virus taxonomy: creating a sequence-based framework for family-level virus classification. *Microbiome*, 6(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0422-7>
- Alphapapillomavirus. (2010). Retrieved February 12, 2020, from https://viralzone.expasy.org/187?outline=all_by_species
- Alves, R., Gaspar, Ângela, G., & Ferreira, M. (2007). Reacções alérgicas a vacinas. *Revista Portuguesa de Imunologia*, 465–483.
- Asselin, O., McIver, A., Grove, A., Reed, L., Stuart, J., Havens, E., & Omi, S. H. (2013). *Global Vaccine Action Plan: 2011-2020*. USA: WHO. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.02.015>
- Assis, D. R. e Jan. de, Tenore, S. de B., Pinho, J. R. R. e Bell., Lewi, D. S. e Alomã., & Ferreira, P. R. e Obert. A. (2015). Characteristics of an outpatient chronic hepatitis B virus infection cohort. *Einstein*, 13(2), 189–195. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015AO3269>
- Astuti, I. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Elsevier*, 14, 407–412.
- Banadyga, L., & Marzi, A. (2017). Closer than ever to an Ebola virus vaccine. *Expert Review of Vaccines*, 16(5), 401–402. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1309977>
- Beck, J., & Nassal, M. (2007). Hepatitis B virus replication. *World Journal of Gastroenterology*, 13(1), 48–64. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i1.48>
- Berzofsky, J. A., Ahlers, J. D., Janik, J., Morris, J., Oh, S., Terabe, M., & Belyakov, I. M. (2004). Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections. *Journal of Clinical Investigation*, 114(4), 450–462. <https://doi.org/10.1172/jci22674>
- Bruni, L., Diaz, M., Barrionuevo-Rosas, L., Herrero, R., Bray, F., Bosch, F. X., ... Castellsagué, X. (2016). Global estimates of human papillomavirus vaccination coverage by region and income level: A pooled analysis. *The Lancet Global Health*, 4(7), e453–e463. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30099-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30099-7)
- Bukh, J. (2016). The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in

- phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. *Journal of Hepatology*, 65(1), S2–S21. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.035>
- Burk, R. D., Chen, Z., & Van Doorslaer, K. (2009). Human papillomaviruses: Genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics*, 12(5–6), 281–290. <https://doi.org/10.1159/000214919>
- Business case for WHO immunization activities on the African continent*. (2018).
- Callaway, E. (2020). The race for Coronavirus vaccines. *Nature*, 580, 576–577. Retrieved from <https://media.nature.com/original/magazine-assets/d41586-020-01221-y/d41586-020-01221-y.pdf>
- Campbell, G. L., Hills, S. L., Fischer, M., Jacobson, J. A., Hoke, C. H., Hombach, J. M., ... Ginsburg, A. S. (2011). Estimated global incidence of Japanese encephalitis: a systematic review. *Bull World Health Organization*, 89(10), 766–774. <https://doi.org/10.2471/BLT.10.085233>
- Cann, A. J. (2012). *Principles of Molecular Virology*. *Principles of Molecular Virology* (Fifth Edit). Waltham: Elsevier.
- Carneiro, A., Belo, A., Gouveia, M., Costa, J., & Borges, M. (2011). Efectividade clínica e análise económica da vacinação preventiva. Retrieved February 9, 2020, from www.actamedicaportuguesa.com
- Chua, J. V., & Chen, W. H. (2010). Bench-to-bedside review: Vaccine protection strategies during pandemic flu outbreaks. *Critical Care*, 14(2). <https://doi.org/10.1186/cc8891>
- Criscuolo, E., Caputo, V., Diotti, R. A., Sautto, G. A., Kirchenbaum, G. A., & Clementi, N. (2019). Alternative methods of vaccine delivery: An overview of edible and intradermal vaccines. *Journal of Immunology Research*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/8303648>
- Da Silva, L. J., & Richtmann, R. (2006). Vaccines under development: Group B streptococcus, herpes-zoster, HIV, malaria and dengue. *Jornal de Pediatria*, 82, 115–124. <https://doi.org/10.2223/JPED.1476>
- Das Graças, M., Leto, P., Francisco, G., Júnior, S., Porro, A. M., & Tomimori, J. (2011). Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *An Bras Dermatol*, 86(2), 306–317.
- Despacho n.º 12434/2019 do Ministério Da Saúde (2019). Diário da Republica, série II de 2019-12-30. Retrieved from https://dre.pt/web/guest/home/-/dre/127608823/details/maximized?serie=II&parte_filter=31&day=2019-12-30&date=2019-12-01&dreId=127608810

- Ehrhardt, S. A., Zehner, M., Krähling, V., Cohen-dvashi, H., Kreer, C., Elad, N., ... Schommers, P. (2019). Polyclonal and convergent antibody response to Ebola virus vaccine rVSV-ZEBOV. *Nature Medicine*, 25(October), 1589–1600. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0602-4>
- Emanuele, A. A. A. C. R. G. (2014). Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde (p. 252). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Fanale-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoi, B., & Buttò, S. (2010). HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita*, 46(1), 5–14. <https://doi.org/10.4415/ANN>
- Fernandes, T. (2019). *Programa Nacional de vacinação - Boletim*. Lisboa. Retrieved from <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/boletim-n-2-do-programa-nacional-de-vacinacao-maio-2019-pdf.aspx>
- Fernandes, T., & Freitas, G. (2017a). Atualização do Programa Nacional de Vacinação: PNV 2017. *Séries DGS - Informação e Análise*, (1), 1–13. Retrieved from <https://www.sns.gov.pt/noticias/2017/02/27/series-dgs-informacao-e-analise/>
- Fernandes, T., & Freitas, G. (2017b). *Atualização do Programa Nacional de Vacinação: PNV 2017*. Lisboa. Retrieved from [https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/18075/1/Séries DGS - Informação e Análise%2C Ano I nº 1.pdf](https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/18075/1/Séries%20DGS%20-%20Informação%20e%20Análise%20Ano%20I%20nº%201.pdf)
- Geels, M., & Ye, K. (2010). Developments in High-Yield System Expressed Vaccines and Immunotherapy. *Recent Patents on Biotechnology*, 4(3), 189–197. <https://doi.org/10.2174/187220810793611518>
- Gersch, E., Gissmann, L., & Garcea, R. (2012). New Approaches to Prophylactic Human Papillomavirus Vaccines for Cervical Cancer Prevention. *National Institutes Of Health*. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Gheit, T. (2019). Mucosal and cutaneous human papillomavirus infections and cancer biology. *Frontiers in Oncology*, 9(MAY), 355. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00355>
- Giroir, B. P. (2020). The time is now to end the HIV epidemic. *American Journal of Public Health*, 110(1), 22–24. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2019.305380>
- Global hepatitis report, 2017*. (2019).
- Gomes, M. C. (2003). História da Vacinação. Retrieved November 19, 2019, from <https://webpages.ciencias.ulisboa.pt/~mcgomes/vacinacao/historia/index.html>
- Graham, S. V. (2017, September 1). The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: A comprehensive review. *Clinical Science*. Portland Press Ltd.

<https://doi.org/10.1042/CS20160786>

- Griffin, D. E., Lin, W. H., & Pan, C. H. (2012). Measles virus, immune control, and persistence. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(3), 649–662. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00330.x>
- Guimarães, C. (2011). Desenvolvimento de vacina efetiva esbarra em série de obstáculos. *Ciências e Cultura*, 63(2), 21–23. <https://doi.org/10.21800/s0009-67252011000200008>
- Heffelfinger, J. D. (2017). *Weekly epidemiological record*. Switzerland. Retrieved from <http://apps.who.int/>
- Heffelfinger, J. D. (2020). *Weekly epidemiological record*.
- Hefferon, K. (2014). Plant virus expression vector development: New perspectives. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2014/785382>
- Huber, S. R., van Beek, J., de Jonge, J., Luytjes, W., & van Baarle, D. (2014). T cell responses to viral infections - opportunities for peptide vaccination. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00171>
- Jit, M., Brisson, M., Portnoy, A., & Hutubessy, R. (2014). Cost-effectiveness of female human papillomavirus vaccination in 179 countries: A PRIME modelling study. *The Lancet Global Health*, 2(7), 406–414. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(14\)70237-2](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(14)70237-2)
- Kaić, B., & Tešović, G. (2019). Measles outbreak: A warning sign of troubles ahead. *Croatian Medical Journal*, 60(5), 393–396. <https://doi.org/10.3325/cmj.2019.60.393>
- Kang, S. M., Kim, M. C., & Compans, R. W. (2012). Virus-like particles as universal influenza vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 11(8), 995–1007. <https://doi.org/10.1586/erv.12.70>
- Kano, F. S., Vidotto, O., & Vidotto, M. C. (2007). Vacina de DNA: aspectos gerais e sua aplicação na medicina humana e veterinária. *Semina: Ciências Agrárias*, 28(4), 709. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2007v28n4p709>
- Korsman, S. N. J., Zyl, G. U. Van, Nutt, L., Andersson, M. I., & Preiser, W. (2012). *Virology* (First Edit). CHURCHILL LIVINGSTONE - Elsevier. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Kumar, S., Nyodu, R., Maurya, V. K., & Saxena, S. K. (2020). Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)*, 23–31. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7_3
- Lakhtakia, R. (2014). The legacy of Robert Koch: Surmise, search, substantiate. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 14(1), 37–41. <https://doi.org/10.12816/0003334>

- Lambert, P. H., & Laurent, P. E. (2008). Intradermal vaccine delivery: Will new delivery systems transform vaccine administration? *Vaccine*, 26(26), 3197–3208. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.095>
- Levinson, W. (2014). *Microbiologia Médica e Imunologia* (Decima Seg). Artemed Editora.
- Lewandowska-Polak, A., Brauncajs, M., Paradowska, E., Jarzebska, M., Kurowski, M., Moskwa, S., ... Kowalski, M. L. (2015). Human parainfluenza virus type 3 (HPIV3) induces production of IFN γ and RANTES in human nasal epithelial cells (HNECs). *Journal of Inflammation*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s12950-015-0054-7>
- Loreto, S., & Azevedo-Pereira, J. M. (2012). A infecção por HIV – importância das fases iniciais e do diagnóstico precoce. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 1(2), 5–17. Retrieved from <http://www.actafarmacêuticaportuguesa.com/index.php/afp/article/view/18/19>
- Ma, B., Maraj, B., Tran, N. P., Knoff, J., Chen, A., Alvarez, R. D., ... Wu, T.-C. (2012). Emerging human papillomavirus vaccines. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 17(4), 469–492. <https://doi.org/10.1517/14728214.2012.744393>
- Madigan, M. T., Jack, P., & John, M. M. (2004). *Microbiologia de Brock* (décima edi). Prentice-Hall.
- Maeno, K. (1994). *REPLICATION OF INFLUENZA B VIRUS: BIOLOGICAL FUNCTIONS OF VIRAL NEURAMINIDASE*. *Nagoya J. Med. Sci* (Vol. 57).
- Merler, S., Ajelli, M., Fumanelli, L., Parlamento, S., Pastore y Piontti, A., Dean, N. E., ... Vespignani, A. (2016). Containing Ebola at the Source with Ring Vaccination. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005093>
- Meulendyke, K. A., Croteau, J. D., & Zink, m. C. (2014). HIV life cycle, innate immunity, and autophagy in the central nervous system. *NIH*, 9(565–571), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Morozov, V. A., & Lagaye, S. (2018). Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy. *World J Hepatol*, 10(2), 186–212. <https://doi.org/10.4254/wjh.v10.i2.186>
- Moss, W. J. (2017). Measles. *The Lancet*, 390(10111), 2490–2502. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31463-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31463-0)
- Muennig, P. A., & Khan, K. (2001). Cost-Effectiveness of Vaccination versus Treatment of Influenza in Healthy Adolescents and Adults. *Clinical Infectious Diseases*, 33(11), 1879–1885. <https://doi.org/10.1086/324491>
- Murillo, R., & Ordóñez-Reyes, C. (2019). Human papillomavirus (HPV) vaccination: From clinical studies to immunization programs. *International Journal of Gynecological Cancer*, 29(8),

- 1317–1326. <https://doi.org/10.1136/ijgc-2019-000582>
- Nascimento, I. P., & Leite, L. C. C. (2012). Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(12), 1102–1111. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500142>
- Olejnik, J., Ryabchikova, E., Corley, R. B., & Mühlberger, E. (2011). Intracellular Events and Cell Fate in Filovirus Infection. *Viruses*, 3(8), 1501–1531. <https://doi.org/10.3390/v3081501>
- Orensteina, W. A., & Ahmedb, R. (2017). Simply put: Vaccination saves lives. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(16), 4031–4033. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704507114>
- Paris, S. (2013). *Develop and introduce new and improved vaccines and technologies*. Retrieved from https://www.who.int/immunization/global_vaccine_action_plan/gvap_2017_secretariat_report_nuvi.pdf
- Pereira, G. M. (2014). *Terapia Génica: Conceitos e Aplicações na Medicina Dentária*. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.
- Regules, J. A., Beigel, J. H., Paolino, K. M., Voell, J., Castellano, A. R., Hu, Z., ... Thomas, S. J. (2017). A Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Ebola Vaccine. *New England Journal of Medicine*, 376(4), 330–341. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1414216>
- Roberto, P., & Stephens, S. (2010). Virologia. *Conceitos e Métodos Para a Formação de Profissionais Em Laboratórios de Saúde*, 125–220.
- Rodrigues, B. F., Farias, F., Takara, G., Pavin, L., Sena, L., Nascimento, M., ... Paiva De Sousa, C. (2007). VIRUS INFLUENZA E O ORGANISMO HUMANO. *APS*, 10(2), 210–216.
- Santos, I., De Mello, R. J. V., Dos Santos, I. B., & Dos Santos, R. A. (2010). Estudo quantitativo das células de Langerhans em carcinomas basocelulares com maior e menor potencial de agressividade local. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 85(2), 165–171. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962010000200006>
- Santos, N. S. D. O., Romanos, M. T. V., & Wigg, M. D. (2015). *Virologia Humana (TERCEIRA E)*. RIO DE JANEIRO: GUANABARA KOOGAN. Retrieved from http://www.ghbook.ir/index.php?name=فرهنگ و رسانه های option=com_dbook&task=readonline&book_id=13650&page=73&chckhashk=ED9C9491B4&Itemid=218&lang=fa&tmpl=component
- Saxena, M., Sabado, R. L., Mar, M. La, Mohri, H., Salazar, A. M., Dong, H., ... Miller, E. (2019). Poly-ICLC, a TLR3 agonist, induces transient innate immune responses in patients with treated HIV-infection: A randomized double-blinded placebo controlled trial. *Frontiers in*

- Immunology*, 10, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00725>
- Silvestri, L. S., Taraporewala, Z. F., & Patton, J. T. (2004). Rotavirus Replication: Plus-Sense Templates for Double-Stranded RNA Synthesis Are Made in Viroplasms. *Journal of Virology*, 78(14), 7763–7774. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.14.7763-7774.2004>
- Singh, N., Pandey, A., & Mittal, S. (2010). Avian influenza pandemic preparedness: developing pre-pandemic and pandemic vaccines against a moving target. *National Institutes Of Health*, 12 e 14. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Smith, M. (2018). Eficácia e segurança da vacinação infantil - Pediatria. Retrieved February 9, 2020, from <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/pediatria/vacinação-infantil/eficácia-e-segurança-da-vacinação-infantil>
- Solomon, T., Minh Dung, N., Kneen, R., Gainsborough, M., Vaughn, D. W., & Thi Khanh, V. (2000). Japanese encephalitis. *Neurol Neurosurg Psychiatry*, 68, 405–415.
- Staats, H. F., & Thompson, A. L. (2011). Cytokines: The future of intranasal vaccine adjuvants. *Clinical and Developmental Immunology*. <https://doi.org/10.1155/2011/289597>
- Strauss, James H., S. E. G. (2008). *Viruses and Human Disease* (second edi). Elsevier.
- Suh, H., Shin, J., & Kim, Y.-C. (2014). Microneedle patches for vaccine delivery. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 3(1), 42. <https://doi.org/10.7774/cevr.2014.3.1.42>
- Suschak, J. J., & Schmaljohn, C. S. (2019). Vaccines against Ebola virus and Marburg virus: recent advances and promising candidates. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 15(10), 2359–2377. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1651140>
- Swanson, K. A., Schmitt, H. J., Jansen, K. U., & Anderson, A. S. (2015). Adult vaccination. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 11(1), 150–155. <https://doi.org/10.4161/hv.35858>
- Tang, D. C. C., Zhang, J., Toro, H., Shi, Z., & Van Kampen, K. R. (2009). Adenovirus as a carrier for the development of influenza virus-free avian influenza vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 8(4), 469–481. <https://doi.org/10.1586/erv.09.1>
- Taubenberger, Jeffery K. and Morens, D. M. (2008). The Pathology of Influenza Infections. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Taubenberger, J. K., & Morens, D. M. (2008). The pathology of influenza virus infections. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154316>
- Tesini, B. L. (2018). Infecções por vírus da parainfluenza - Doenças infecciosas. Retrieved December 18, 2019, from <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/doenças-infecciosas/vírus-respiratórios/infecções-por-vírus-da-parainfluenza>

- Trask, S. D., McDonald, S. M., & Patton, J. T. (2012, March 23). Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2673>
- Uddin, M., Allon, A., Roni, M. A., & Kouzi, S. (2019). Overview and Future Potential of Fast Dissolving Buccal Films as Drug Delivery System for Vaccines. *J Pharm Pharm Sci*, 388–406.
- Vanderslott, S., Dadonait, B., & Roser, M. (2019). Vaccination. *Our World Data*. Retrieved from <https://ourworldindata.org/vaccination>
- Wang, H., Zhang, Y., Huang, B., Deng, W., Quan, Y., Wang, W., ... Yang, X. (2020). Development of an Inactivated Vaccine Candidate, BBIBP-CorV, with Potent Protection against SARS-CoV-2. *Elsevier*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.008>
- Yi, L., Lee, Y., Izzard, L., & Hurt, A. C. (2018). A Review of DNA Vaccines Against Influenza, 9(July), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01568>
- Zardo, G. P., Farah, F. P., Mendes, F. G., Franco, C. A. G. dos S., Molina, G. V. M., de Melo, G. N., & Kusma, S. Z. (2014). Vacina como agente de imunização contra o HPV. *Ciencia e Saude Coletiva*, 19(9), 3799–3808. <https://doi.org/10.1590/1413-81232014199.01532013>