

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE JOAQUIM VENÂNCIO
LABORATÓRIO DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL EM TÉCNICAS LABORATORIAIS
EM SAÚDE

Renan Bral Coelho Comassetto

PRODUÇÃO DA VACINA DA POLIOMIELITE UTILIZANDO CÉLULA VERO

Rio de Janeiro

2012

Renan Bral Coelho Comassetto

PRODUÇÃO DA VACINA DA POLIOMIELITE UTILIZANDO CÉLULA VERO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio como requisito parcial para aprovação no curso técnico de nível médio em saúde com habilitação em Análises Clínicas.

Orientadora: Emanuele Amorim Alves

Rio de Janeiro

2012

Renan Bral Coelho Comassetto

PRODUÇÃO DA VACINA DA POLIOMIELITE UTILIZANDO CÉLULA VERO

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio como requisito parcial para aprovação no curso técnico de nível médio em saúde na habilitação em Análises Clínicas.

Aprovado em: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Emanuele Amorim Alves – FIOCRUZ / EPSJV / LATEC

Prof. Flávio Henrique Marcolino da Paixão – FIOCRUZ / EPSJV / LATEC / SAP

Prof^ª. Selma Majerowicz – FIOCRUZ / EPSJV / LATEC

*Dedico esse trabalho a Deus e a cada membro da minha
família.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus pela minha vida e pelas chances e vitórias que vem me ajudando a conquistar. Assim como gostaria de agradecer a Nossa Senhora por também escutar minhas preces de desespero nessa reta final de Politécnica. Agradeço também aos meus amigos espirituais que sempre estiveram comigo me dando forças para seguir mais um dia sofrido de monografia.

Agradeço aos meus pais por me colocarem no mundo e, principalmente, por se conterem bastante para não me tirar dele nas horas de estresse! Agradeço aos meus familiares que sempre estiveram comigo me ajudando no que fosse possível para meus estudos. Um beijo especial para: Sandra, minha mãe, Antônio, meu pai, Isabel, minha avó, Gabriella, minha irmã, Margarida, mais que uma tia, Manoel, mais que um tio, Luiza, minha tia, Aline, minha prima, Amanda, minha madrinha, Cátia, minha prima. Também agradeço a uma pessoa tão importante quanto às citadas, que infelizmente não está mais entre nós fisicamente, minha tia/mãe Cecília que foi uma das responsáveis pela pessoa que sou hoje.

Quero agradecer aos meus professores que ao longo da minha história acadêmica acreditaram em mim e auxiliaram no meu crescimento educacional. Quero dar ênfase ao professor Flávio Paixão, integrante da minha banca examinadora, que desde a escolha do meu tema se mostrou empolgado e sempre me ajudando do que pode e não pode, e claro me acompanhou desde o pré-projeto até os pontos finais do trabalho! A Selma, também integrante da banca, que auxiliou no crescimento do trabalho, a Cleide e a Mônica por tudo que fizeram por mim num momento de desespero e a minha orientadora Emanuele por me acompanhar ao longo do trabalho e me inspirar.

Agradeço a Marileide Nascimento Silva do LAVSA e ao Deivid Wanderson Couto do Anjos do departamento de imunologia do INCQS pela grande ajuda fornecendo artigos para enriquecimento do meu trabalho, e claro a Cíntia Soares, que me apresentou ao Deivid!!

Gostaria de agradecer aos meus lindos amigos que sem eles não seria ninguém nessa escola: Luana, Ana Castro, Amanda, Flávio, Beatriz, Patrícia, Paulo Roberto, Thais Affonso e Rebecca Leão! Amo vocês! Aproveitando a deixa dos amigos, quero agradecer aos meus amigos que estiveram comigo do dia que surtei sempre me apoiando e ajudando, além dos já citados, são eles: Helver e Hugo! Além dos outros amigos, que não tenho mais espaço para citá-los.

“Eu fico com a pureza da resposta das crianças, é a vida, é bonita e é bonita. Viver e não ter a vergonha de ser feliz, cantar e cantar e cantar a beleza de ser um eterno aprendiz, eu sei que a vida devia ser bem melhor e será, mas isso não impede que eu repita, é bonita, é bonita e é bonita.”

Luiz Gonzaga Filho

RESUMO

A Poliomielite é uma doença infectocontagiosa viral de transmissão oral-oral ou fecal-oral. Possui diversos sintomas e, em sua forma mais grave, pode atingir o sistema nervoso central causando paralisia assimétrica dos membros inferiores. As crianças são mais susceptíveis, porém pode infectar pessoas de diferentes faixas etárias. O vírus causador da doença é o Poliovírus, uma espécie de *enterovirus* da família *Picornaviridae*. É um vírus muito pequeno, facilitando a sua disseminação muito rapidamente, tendo maior incidência nos trópicos, nas regiões temperadas e no período do verão e do outono. Teve grande incidência durante séculos, até a administração da vacina contra a poliomielite, quando os dados epidemiológicos tiveram grandes mudanças. Atualmente existem duas vacinas utilizadas no controle da poliomielite. A primeira é a vacina Salk, uma vacina com o vírus inativado e injetável; a segunda é a Sabin, uma vacina que contém o vírus inativado e é administrada oralmente, sendo mais bem aceita pelas crianças. Foi utilizada no primeiro programa de erradicação da doença elaborado por Albert Sabin, desenvolvedor da vacina, e continuou no programa de vacinação anual. A Vacina Oral contra a Poliomielite é produzida em cultura de células Vero. Essa é uma célula que foi extraída do rim do macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), e foi transformada laboratorialmente em uma célula imortal. É uma célula susceptível a diversos vírus e tem sido utilizada até hoje extensivamente em ensaios de placas e para replicação de vírus.

Palavras-chave: Vacina Oral contra Poliomielite. Célula Vero. Poliomielite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Paralisia flácida nos membros inferiores de forma assimétrica	09
Figura 2 – Pedra egípcia do período de 1580-1380 a.C. com imagem de um homem com possível sequela de poliomielite	10
Figura 3: Esquema do cérebro humano	11
Figura 4 – Vírus da Poliomielite	12
Figura 5: Esquema de partícula do picornavírus	13
Figura 6: Biossíntese do Picornavírus	14
Figura 7 – Mapa atual da distribuição epidemiológica da poliomielite	15
Figura 8 – Albert Sabin vacinando uma criança com a vacina oral contra a poliomielite	19
Figura 9: Zé gotinha, símbolo nacional do Programa de Vacinação contra a Poliomielite no Brasil	21
Figura 10 – Cultura de célula Vero	24
Gráfico 1 – Número de casos notificados de paralisia flácida aguda e confirmados de poliomielite. Brasil, 1980-2003	16

Lista de siglas

SNC – Sistema Nervoso Central

pH – Potencial Hidrogênico

RNA – Ácido Ribonucleico

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina B

VOP – Vacina Oral Contra a Poliomielite

VIP – Vacina Injetável Contra Poliomielite

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

DICIT – Dose infecciosa citopática

PTC – Points to Consider

CBER: Centro que regulariza produtos biológicos para uso humano sob as leis federais

ICH: Organização da qual uniformiza a interpretação das diretrizes e requisitos técnicos para registro de produtos farmacêuticos em pesquisas e desenvolvimento de medicamentos

Sumário

1 – INTRODUÇÃO.....	9
1.1 – POLIOMIELITE.....	9
1.2 – O POLIOVÍRUS.....	12
1.3 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	15
1.4 – VACINAS.....	17
2 – JUSTIFICATIVA.....	18
3 – OBJETIVOS.....	18
3.1 – OBJETIVO.....	18
3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4 – VACINA ORAL CONTRA A POLIOMIELITE (VACINA SABIN).....	19
4.1 – ALBERT SABIN.....	19
4.2 – A VACINA.....	20
4.2.1 – Fatores que Inviabilizam a Administração da Vacina Sabin.....	22
4.3 – PRODUÇÃO DA VACINA.....	23
5 – CÉLULA VERO.....	24
5.1 – HISTÓRICO.....	24
5.2 – CARACTERIZAÇÃO DA CÉLULA VERO.....	25
5.2.1 – Testes Utilizados na Caracterização de Células.....	26
5.2.2 – Características da Célula Vero.....	28
6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – POLIOMIELITE

A poliomielite, também conhecida como “paralisia infantil”, é uma doença infectocontagiosa viral aguda causada pelo Poliovírus, um *enterovirus* da família *Picornaviridae* (BRASIL, 2005), que, em sua forma mais grave, pode afetar o sistema nervoso central (SNC) atingindo os neurônios e destruindo-os (BRASIL, 1988).

Uma vez que os neurônios motores no cordão espinhal são destruídos, o indivíduo contaminado pelo poliovírus adquire uma espécie de paralisia flácida, que é resultado da perda do tônus muscular afetando, basicamente, os membros inferiores de forma assimétrica (figura 1) (PLOTKIN E EDWARD, 1972).



Figura 1 – Paralisia flácida nos membros inferiores de forma assimétrica.

Fonte: <http://www.portalsaofrancisco.com.br>

A transmissão da poliomielite ocorre de modo direto pessoa a pessoa por via fecal-oral ou oral-oral, sendo favorecida em aglomerados e em más condições habitacionais (FIOCRUZ, 2005).

O poliovírus contamina os humanos desde muito tempo. A poliomielite é uma doença muito antiga, tendo registros de sua existência na pré-história em pinturas do antigo Egito onde retratavam pessoas com os membros atrofiados (Figura 2) (FIOCRUZ, 2005). Porém, só passou a ser reconhecida como um problema de saúde no final do século XIX quando os primeiros surtos endêmicos foram relatados, tendo a primeira e melhor descrição em 1887. Nesse período, as endemias cresciam cada vez mais, principalmente em países industrializados, por conta do crescimento da população e, em sua maior parte, evoluía para a doença mais severa e, até a morte (PLOTKIN E EDWARD, 1972).



Figura 2 – Pedra egípcia do período de 1580-1380 a.C. com imagem de um homem com possível sequela de poliomielite.

Fonte: FIOCRUZ, 2005.

Ao longo do período que a doença se disseminava tornando-se uma endemia, aumentavam as pesquisas feitas em prol do reconhecimento do principal causador da doença. Na primeira metade do século XX, Landsteiner e Popper foram capazes de reproduzir a doença em macacos, nos quais foi inoculada uma solução de tecido de sistema nervoso obtido de um caso fatal. Porém, o macaco não foi um modelo ideal para elucidar suas características e, em 1939, Armstrong adaptou a cepa viral para roedores, o que tornou possível isolar o poliovírus tipo 2. Alguns anos depois, Li e Schaeffer conseguiram isolar o tipo 1 em

camundongos, em seguida foi descoberto o tipo 3, sendo determinado que só existem três sorotipos do poliovírus (PLOTKIN E EDWARD, 1972).

Apesar de ser uma doença grave que possui diversos sintomas, a infecção pelo poliovírus pode se apresentar de forma assintomática, sendo reconhecidas por isolamento de vírus ou pelo aumento da taxa de anticorpos. Nesse tipo de infecção, o vírus ataca o intestino e os tecidos linfoides adjacentes, produzindo anticorpos específicos, e a contaminação é contida neste ponto (BRASIL, 1988). Porém, pode apresentar sintomas e seus diferentes quadros são: suave, meningite asséptica ou paralisia.

O primeiro é o mais comum, e apresenta apenas um quadro viral inespecífico de febre, sonolência, dor de cabeça e musculares, vômitos e náusea, tendo duração de cerca de 3 a 4 dias (BRASIL, 1988).

A meningite asséptica é caracterizada como poliomielite não parálitica e possui, na sua fase inicial, os mesmos sintomas da doença suave. Após dois dias os pacientes passam a apresentar rigidez no pescoço e nas costas, e, algumas vezes, vômito, sinais característicos da meningite. A doença dura apenas de dois a dez dias e sua recuperação é completa. Em poucos casos causa fraqueza muscular e paralisia (SANTOS, 2008).

Em casos mais graves, a doença pode causar paralisia. Uma vez atingindo o SNC, o poliovírus se dissemina no cérebro e no cordão espinhal, causando uma destruição de substância cinzenta do corno anterior do cordão espinhal e os núcleos da ponte do bulbo. O primeiro possui fibras nervosas dos neurônios motores e o segundo está relacionado com o controle de vômitos e de reflexos nervosos. Causando os efeitos colaterais, como o vômito e, principalmente, o comprometimento dos neurônios motores (BRASIL, 1988).

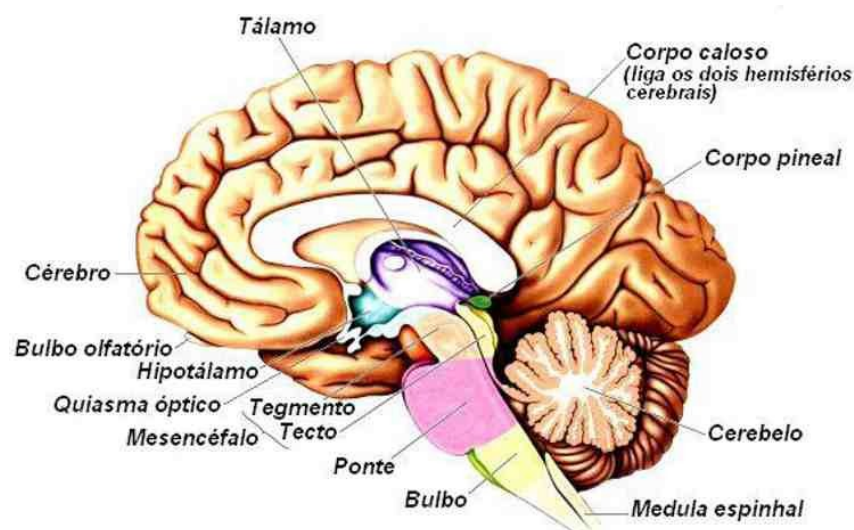


Figura 3: Esquema do cérebro humano.

Fonte: www.portalsaofrancisco.com.br

A poliomielite é uma doença que ocorre mundialmente, principalmente nos trópicos, nas regiões temperadas e no período do verão e do outono (BRASIL, 1988). O poliovírus se dissemina muito rápido. Uma vez que um indivíduo seja diagnosticado com poliomielite as pessoas suscetíveis à doença que estão em contato com o indivíduo no convívio direto também irão ser infectados (PLOTKIN E EDWARD, 1972).

A doença pode ocorrer em qualquer faixa etária, porém, as crianças são mais suscetíveis, pois ainda não adquiriram imunidade. No entanto, ainda existem lugares isolados dos quais toda a população é infectada, independente da idade (PLOTKIN E EDWARD, 1972).

1.2 – O POLIOVÍRUS

O vírus da poliomielite (figura 4) é um enterovírus da família *Picornaviridae* e possui três sorotipos diferentes, tendo como destino primário o intestino (SANTOS, 2008). O período de incubação do vírus é de 7 a 14 dias. O vírus se mantém estável em pH entre 3,0 e 5,0 por até três horas e é inativado em temperaturas acima de 55° C (PLOTKIN E EDWARD, 1972).

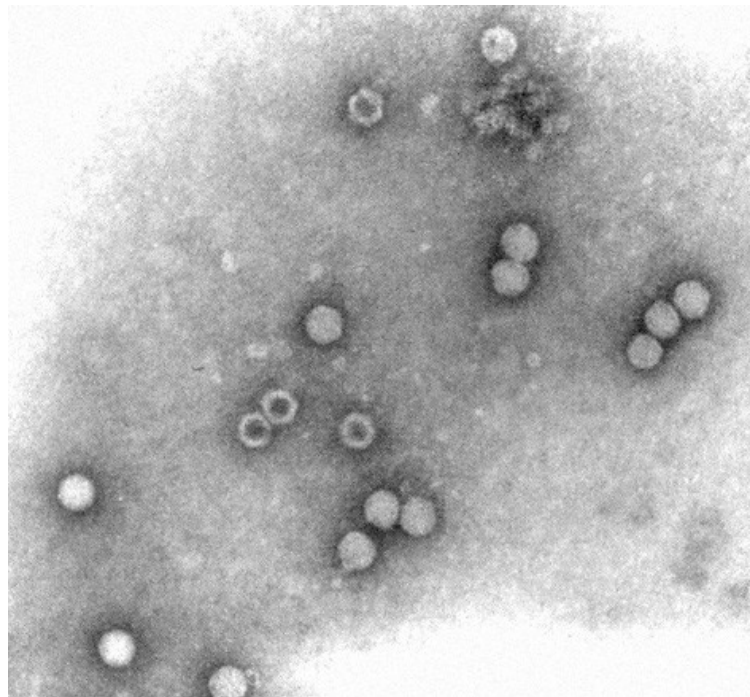


Figura 4 – Vírus da Poliomielite.

Fonte: Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral – IOC – FIOCRUZ.

É um vírus pequeno com cerca de 28 nm de diâmetro (de 25 nm a 30 nm) e o fato de ser um vírus pequeno, o Poliovírus tem disseminação facilitada. É um vírus não envelopado, contendo genoma de fita simples de RNA. Sua forma é esférica, apresentando capsídeo de simetria icosaédrica composto por 60 capsômeros (dado comprovado por difração por raios X, observação ao microscópio eletrônico e estudos bioquímicos) (figura 4). Cada um dos capsômeros é formado por quatro polipeptídeos denominados VP1, VP2, VP3 e VP4. O último é o mais interno e está associado ao ácido nucleico (SANTOS, 2008).

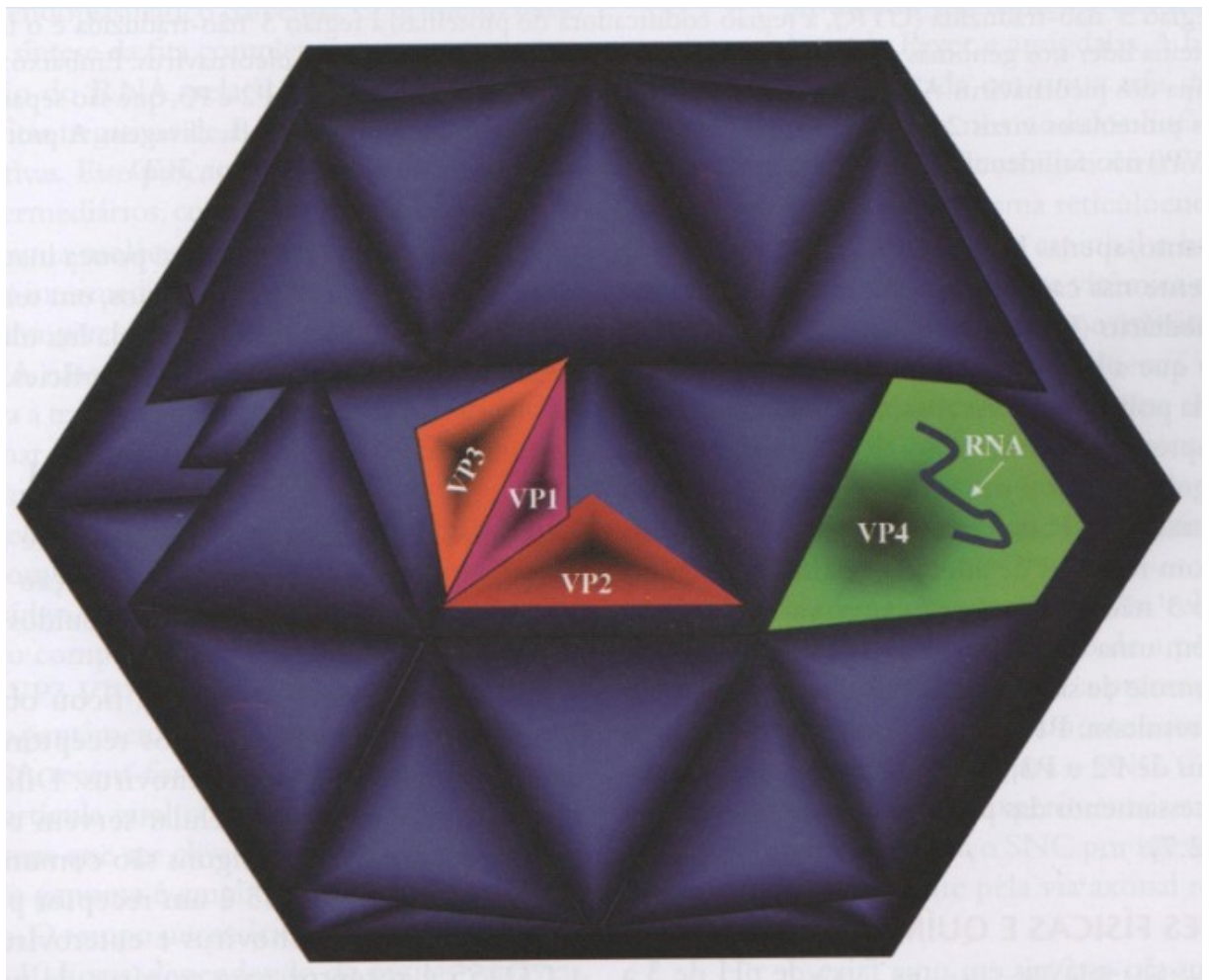


Figura 5: Esquema de partícula do picornavírus.

Fonte: SANTOS, 2008.

O vírus requer o receptor primário e a proteína CD155, uma proteína integral da membrana e membro da superfamília de imunoglobina (Ig) para infectar a célula-alvo (SANTOS, 2008). A ausência desse receptor na célula é o que a torna resistente ao vírus. Essa restrição pode ser superada pela transfecção do poliovírus ou pela introdução do vírion inteiro

por meios de lipossomo¹ sintéticos (PLOTKIN E EDWARD, 1972). Uma vez dentro da célula, a replicação do vírus se dá inteiramente no citoplasma (SANTOS, 2008). O RNA do poliovírus serve tanto como fonte de informação genética como seu próprio RNA mensageiro. A proteína viral é sintetizada em polissomos² que são mantidos juntos por um RNA viral (Figura 5) (PLOTKIN E EDWARD, 1972).

Após a adsorção do vírus, o RNA é liberado pela desestabilização do capsídeo que resulta em partículas sem a proteína VP4. Então, ocorre a clivagem da VPg por uma fosfodiesterase, e o RNA é traduzido pelos ribossomos da célula e a clivagem da poliproteína para produzir proteínas virais individuais. Logo inicia-se a replicação no retículo endoplasmático da célula e a tradução de proteínas virais adicionais. Enfim, é feita a montagem do capsídeo, o VP0 é clivado em VP2 e VP4 para ao vírus ser infectante, é novas partículas virais são liberadas por lise (BRASIL, 1988).

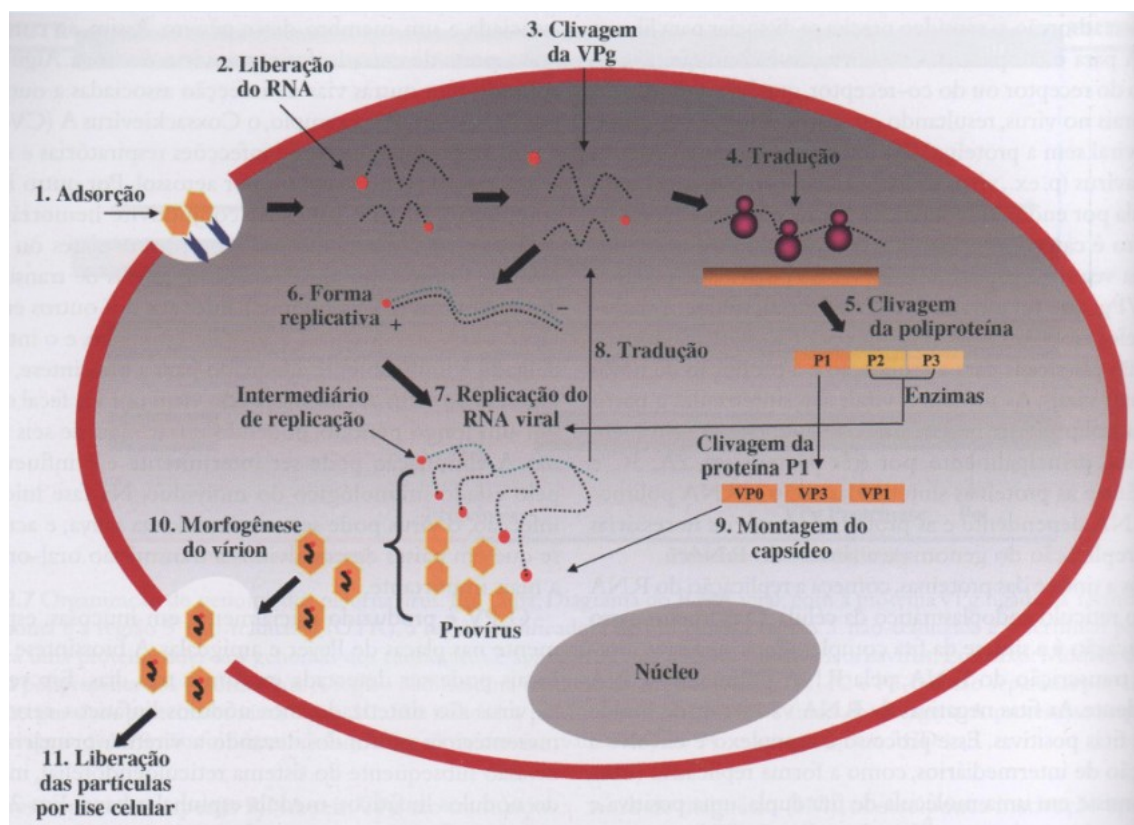


Figura 6: Biossíntese do Picornavírus.

Fonte: SANTOS, 2008.

¹ Lipossomo: vetor de transporte não viral de genes.

² Polissomo: vários ribossomos, antes livres no citoplasma, ligados a uma molécula de RNAm.

1.3 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

O poliovírus permaneceu em forma endêmica durante muitos séculos, infectando crianças recém-nascidas, tendo a sua circulação ininterrupta. Após a administração de vacinas contra a poliomielite os padrões epidemiológicos tiveram significativas mudanças, inclusive levando à erradicação da doença em alguns países (Plotkin e Edward, 1972). Entretanto, em algumas áreas do continente asiático e africano, ainda existem focos da doença (BRASIL, 2003) (figura 7).

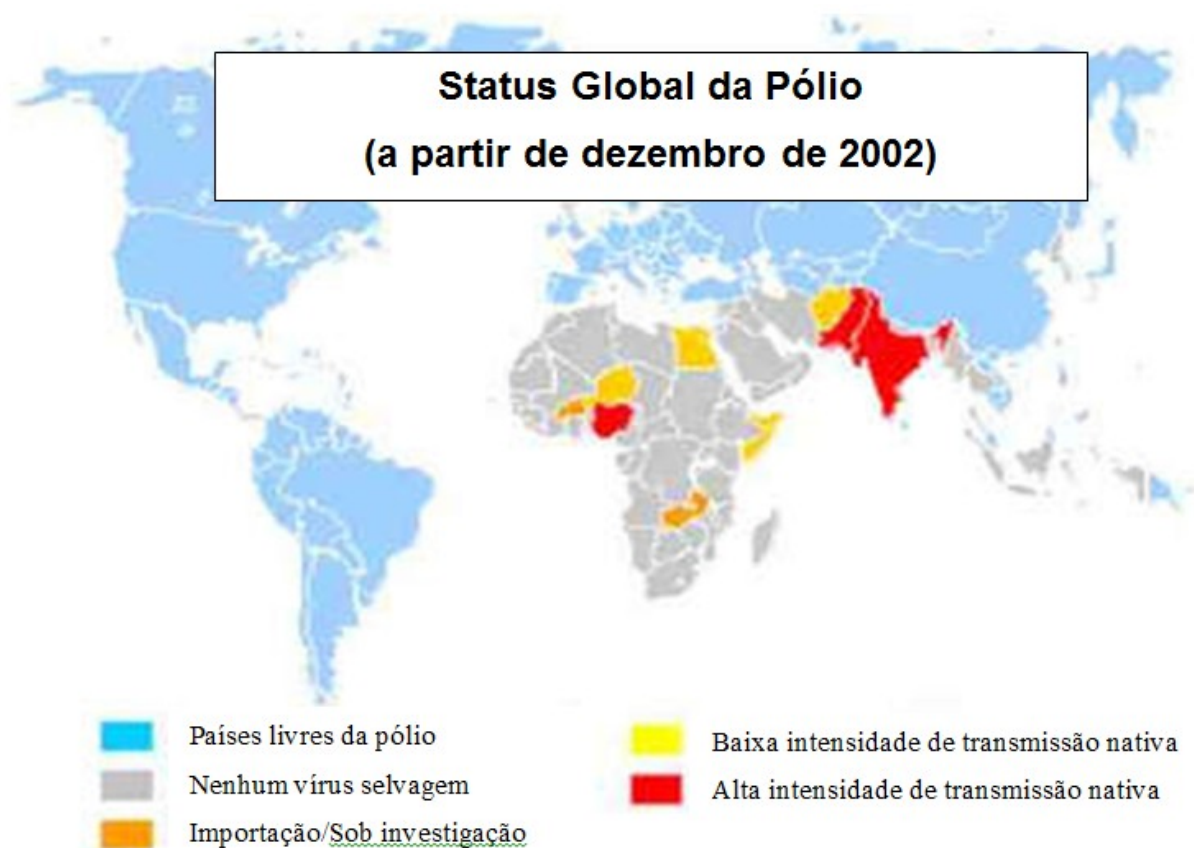


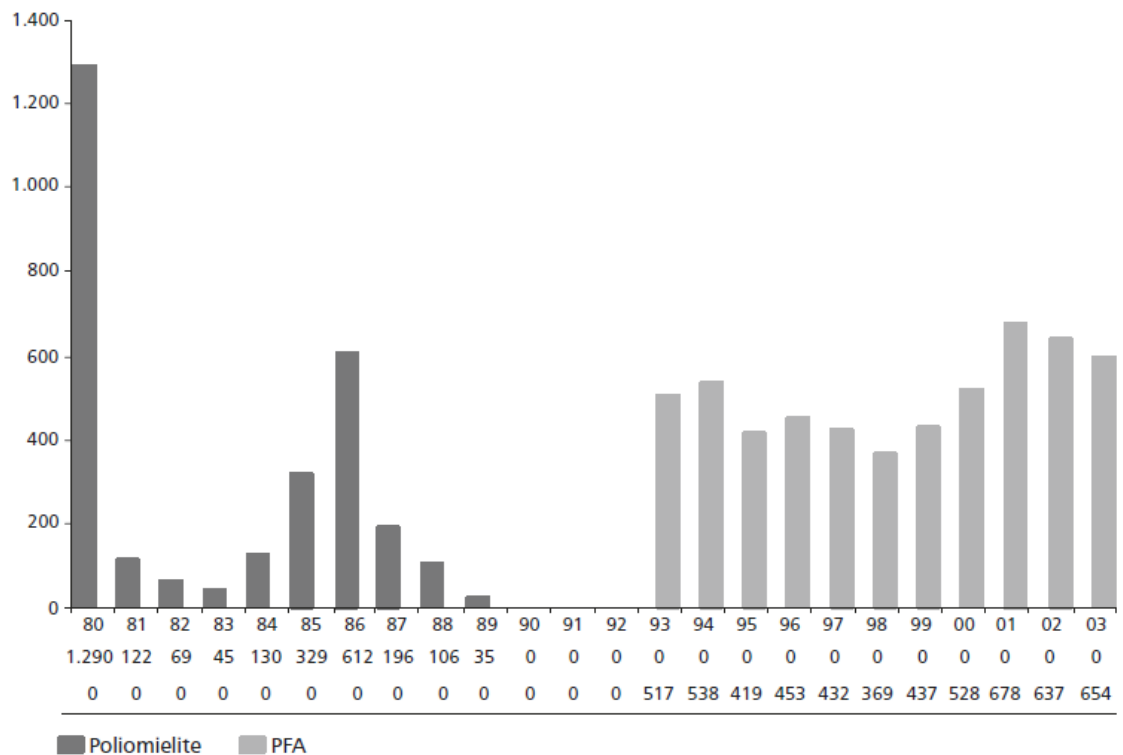
Figura 7 – Mapa atual da distribuição epidemiológica da poliomielite.

Fonte: <http://www.portalsaofrancisco.com.br/>

No Brasil, até meados da década de 1980, a poliomielite teve grande incidência e durante muito tempo tentou-se diversas estratégias para controlar a doença (BRASIL, 2005). Em 1961 a vacina oral foi disponibilizada, porém não foi distribuída adequadamente e, ao longo da década de 1960 e 1970 ocorriam surtos esporádicos em várias regiões do país. Em 1979, por conta de uma dificuldade econômica no país, houve um surto no Brasil (HAMPTON, 2009).

Sabin³, então, ofereceu ajuda para o governo brasileiro e este aceitou prontamente, fazendo com que o cientista viesse imediatamente. Primeiramente, ele ajudou desenhando e detalhando um plano para a campanha de vacinação em massa, caracterizada como excelente. O plano final de vacinação foi de que todas as crianças menores de cinco anos no país deveriam ser vacinadas com a vacina oral contra a poliomielite, inclusive as que já tinham sido vacinadas anteriormente (HAMPTON, 2009).

O plano de vacinação foi um sucesso, tendo o número de casos diminuído de 2330 em 1975 para 122 casos no ano de 1981 (gráfico 1) (HAMPTON, 2009). O último caso registrado da doença no país ocorreu em 1989, graças à estratégia de erradicação adotada no país em 1988, que consistiu na campanha de vacinação em massa com a vacina oral. A campanha, repetida anualmente a partir de então, obteve sucesso devido ao nível elevado de cobertura vacinal obtido nacionalmente. Logo, a Organização Pan-Americana da Saúde e a Organização Mundial de Saúde certificaram a erradicação da poliomielite nas Américas em 1994 (BRASIL, 2005).



Fonte: Cover/CGDEP/Devep/SVS/MS

Gráfico 1 – Número de casos notificados de paralisia flácida aguda e confirmados de poliomielite. Brasil, 1980-2003.

Fonte: Ministério da Saúde, 2005.

³ Sabin: Desenvolvedor da vacina oral contra a poliomielite (vide capítulo 4, item 4.1).

Com a doença erradicada nas Américas, os países vizinhos tomaram o compromisso de manter as coberturas da vacina alta e homogêneas, fator de grande importância para o controle do poliovírus. Porém, em alguns países a distribuição das vacinas não foi adequada, logo, as cepas do vírus readquiriram neurovirulência, infectando indivíduos de países que já o haviam controlado. Outro fator importante para o ressurgimento da poliomielite é o risco de importação do poliovírus de países que apresentam surtos (BRASIL, 2005)

1.4 – VACINAS

Atualmente existem dois diferentes tipos de vacina contra a poliomielite. Cada vacina com uma forma particular de produção. São elas a vacina oral Sabin, produzida utilizando a célula Vero, uma célula extraída do rim do Macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*), modificada laboratorialmente; e a vacina injetável Salk produzida utilizando a célula MRC-5 (linhagem de células do pulmão do feto humano).

A vacina Sabin é administrada via oral, e tem como público alvo crianças. Além de imunizar o indivíduo vacinado, também imuniza as pessoas de seu convívio pela disseminação do poliovírus vacinal em pouco tempo, o que auxiliou na erradicação da doença (BRASIL, 2003).

A vacina Salk, produzida utilizando a linhagem de célula MRC-5, tem o vírus inativado, e, ao contrário da Sabin, é uma vacina injetável, e administrada no sistema booster.⁴, sendo aplicadas três doses. Sua imunidade se dá através da resposta de IgG, e tem sua imunidade permanente e pode ser aplicada em pessoas com doença imune (BRASIL, 2003).

⁴ Sistema booster: administração das doses da vacina repetindo-se num intervalo de tempo. Por exemplo, a vacina antitetânica, que é repetida a dose a cada 10 anos.

2 – JUSTIFICATIVA

A poliomielite é uma doença infectocontagiosa aguda que possui diversos aspectos clínicos. Em sua forma mais grave, pode causar paralisia nos membros inferiores e prevaleceu de forma endêmica durante muitos anos.

O programa de erradicação da doença se deu pela vacinação em massa de crianças com a vacina oral contra a poliomielite, a vacina Sabin, no final da década de 80. Visto o seu sucesso, a vacina entrou para o programa de controle da doença. Por esse motivo torna-se importante estudar o processo de produção da vacina oral contra a poliomielite ressaltando suas vantagens e desvantagens.

3 – OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVO

O objetivo desse trabalho é estudar a produção da vacina oral Sabin utilizando a célula Vero. Além disso, abordar o histórico do uso desta célula como substrato na produção de vacinas avaliando as vantagens e desvantagens de sua utilização.

3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Abordar o histórico da poliomielite, destacando sua epidemia, seus sintomas e o programa de erradicação da doença;
- Evidenciar as principais diferenças entre as vacinas Sabin e Salk;
- Descrever o histórico e as características da célula Vero;

4 – VACINA ORAL CONTRA A POLIOMIELITE (VACINA SABIN)

4.1 – ALBERT SABIN

Albert Bruce Sabin (figura 8) foi o desenvolvedor da vacina oral contra a poliomielite (VOP) e o principal responsável pela campanha de vacinação e, conseqüentemente, na erradicação da doença nas Américas (BRASIL, 1988). Sabin promoveu a vacinação em massa contra a pólio desde a década de 1960, e na década de 1980 seus esforços tiveram maior repercussão ao se tornar membro de grupos os quais lutavam pela erradicação da poliomielite nas Américas (HAMPTON, 2009).

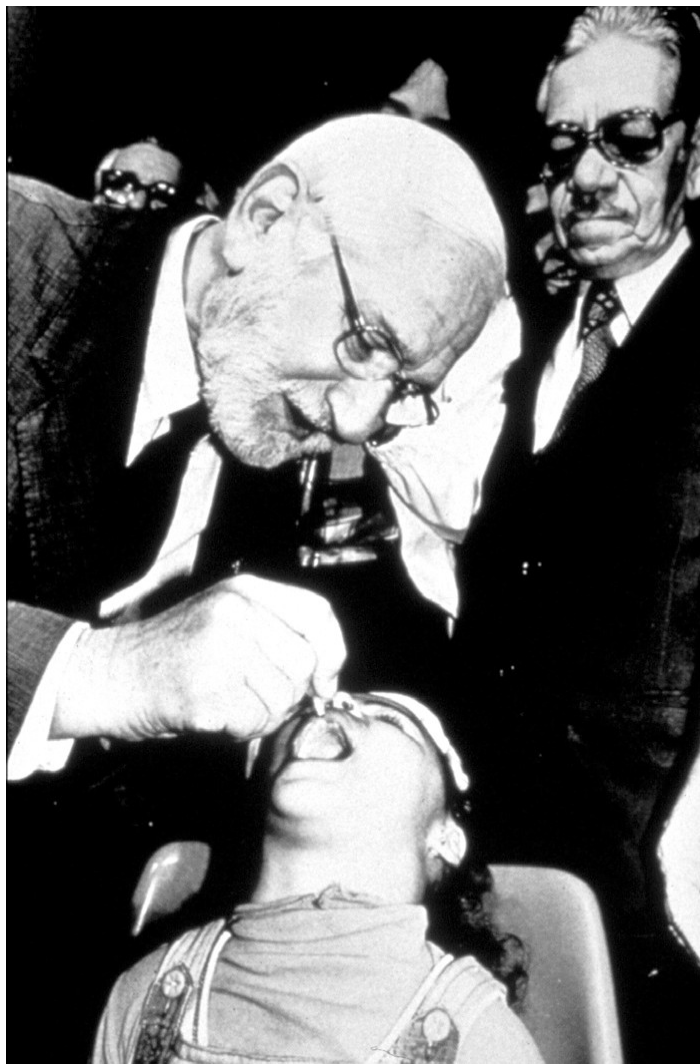


Figura 8 – Albert Sabin vacinando uma criança com a vacina oral contra a poliomielite.

Fonte: HAMPTON, 2009.

Sabin iniciou seu trabalho com doenças infecciosas na Faculdade de Medicina do Rockefeller Institute, agora conhecido como Rockefeller University, focando principalmente

no vírus da pólio. Em seguida, foi para as universidades de Cincinnati e da Carolina do Norte. (HAMPTON, 2009).

A criação de uma vacina que podia ser administrada oralmente e a comprovação de sua eficácia em 1959 tornou Sabin mundialmente famoso, e a sua vacina passou a ser utilizada em todo o mundo por conta da sua fácil administração e baixo custo (HAMPTON, 2009).

Sabin acreditava que o surto de poliomielite poderia ser interrompido uma vez que a cadeia de transmissão do vírus pudesse ser quebrada, e acreditava que a vacina oral poderia quebrar essa cadeia de transmissão pela capacidade de prevenção da replicação do vírus no intestino. Em 1960, tentou chamar atenção da Organização Internacional da Saúde para distribuir a vacina oral para todos os países com a finalidade de ajudar os países que não tinham meios de eliminar a doença. Não obteve sucesso. Assim, Sabin doou os direitos autorais da vacina para a Organização Mundial de Saúde para que esta divulgasse seus planos de vacinação coletiva (HAMPTON, 2009).

4.2 – A VACINA

No Brasil, a Vacina Oral contra a Poliomielite (VOP) é utilizada no programa de imunização infantil. As vantagens da utilização da vacina Sabin são a simplicidade de administração, principalmente em crianças, já que é uma vacina oral e, a capacidade de proporcionar imunização passiva das pessoas de convívio da criança (BRASIL, 2003).

A vacina Sabin é trivalente, ou seja, contém os três sorotipos do vírus atenuados. O seu efeito imune tem tempo prolongado e induz no indivíduo imunizado a formação de anticorpos IgA, começando a agir no intestino, conferindo imunidade intestinal (INFORMAÇÃO ORAL⁵). Além disso, ela confere imunização passiva, que se dá pela liberação de partículas virais pelas fezes e via oral que irão imunizar as pessoas do convívio direto, e imunização do ambiente, uma vez que essas partículas virais irão se depositar no ambiente, assim impedindo que o vírus se propague no ambiente (LOPES et al, 2012, apud, SILVA 2000; BRASIL, 2003).

A vacina Sabin é armazenada em frascos que contém de 20 a 25 doses, e é administrada oralmente aplicando-se duas gotas (0,1 mL) proporcionando boa aceitação pelas

⁵ Informações coletadas durante aula de Cultura de Células e em conversa com professora pesquisadora do Laboratório de Vigilância em Saúde na Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio.

crianças, que compõem o público da campanha de vacinação (BRASIL, 2003). O programa de vacinação contra a poliomielite consiste na vacinação de crianças de um a cinco anos de idade anualmente, para prevenir o contágio cruzado (BRASIL, 1988).



Figura 9: Zé gotinha, símbolo nacional do Programa de Vacinação contra a Poliomielite no Brasil.

Fonte: www.uipi.com.br

A vacina oral é composta pelo poliovírus atenuado, ou seja, o vírus está vivo, porém perdeu sua capacidade de infecção após diversas passagens por cultura de células animais que ele não infectaria normalmente e, dessa forma, o vírus perde a capacidade de infecção. Pode causar febre como reação de resposta da vacina (INFORMAÇÃO ORAL⁶).

Por ter o vírus atenuado, a vacina precisa ser conservada de forma adequada, caso contrário, a vacina perde sua eficácia. Diversos fatores podem interferir na eficácia da vacina, entre eles, más condições de conservação, pH, aplicação incorreta e interferência de outros enterovírus. A temperatura implica na conservação da vacina, uma vez que o vírus é inativado em temperaturas acima de 55°C, e o pH deve estar entre 6 e 6,8 (BRASIL, 1988; PLOTKIN E EDWARD, 1972).

Basicamente, a vacina deve ser mantida num período de dois anos e um ano, respectivamente, em temperaturas entre -25°C e -15°C. Em outros casos a vacina também é mantida num período de três meses e um mês, respectivamente, em temperaturas entre 4°C e 8°C. Porém, a vacina ainda pode ser mantida em temperaturas até 50°C (BRASIL, 1988).

⁶ Informações coletadas durante aula de Cultura de Células na Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio.

A vacina oral pode causar um efeito adverso, do qual pode acarretar reversão de virulência causando a doença na criança vacinada ou em alguma pessoa do seu convívio, devido à presença do vírus vivo (BRASIL, 2003).

Na criança vacinada, o quadro de infecção apresenta febre aguda seguida da paralisia flácida e pode ocorrer dentro de 4 a 40 dias após a vacinação, e apresentando sequelas após 60 dias do início do quadro. O mesmo pode acontecer com uma pessoa do convívio da criança, entretanto, o quadro pode aparecer num intervalo maior, de 4 a 85 dias, e apresentando sequelas no mesmo intervalo de tempo (BRASIL, 2003).

4.2.1 – Fatores que inviabilizam a administração da vacina Sabin

A vacina oral não deve ser administrada caso a criança apresente quadro intenso de vômito e/ou diarreia, uma vez que impede a fixação e multiplicação do vírus vacinal no organismo. Também não deve ser administrada em casos de crianças imunodeprimidas, nem que tenham contato com pessoas com imunodeficiência, pois estes não são capazes de desenvolver anticorpos, e ao serem vacinados, ou entrarem em contado com o vírus atenuado, poderão se infectar e desenvolver a poliomielite (BRASIL, 2003).

Como modo alternativo de vacinação contra a poliomielite, é administrada a Vacina Inativada contra a Poliomielite (VIP), criada por Jonas Salk. Ela é administrada por via intramuscular. A vacina é composta pelo vírus da poliomielite inativado, descartando a possibilidade de replicação viral, nem o aparecimento da doença, o que a torna eficaz na imunização de imunodeprimidos (BRASIL, 2003).

A vacina Salk estimula o sistema imunológico a partir de células humorais induzindo imunidade primária ao indivíduo vacinado (LOPES et al, 2012, apud, SILVA 2000). Por outro lado é desvantajosa, pois a vacina não disponibiliza a disseminação do vírus vacinal no ambiente, pois não induz imunidade intestinal por ter formação exclusiva de anticorpos humorais. Contudo, a vacina reduz a replicação do vírus na faringe, reduzindo a transmissão da doença pela via oral. (BRASIL, 2003).

Entretanto, o grande fator para a escolha da Sabin e não da Salk no Programa Nacional de Imunização é o fato de a Salk ser aplicada via intramuscular, sendo de difícil administração em crianças, enquanto a via oral é muito mais fácil e aceitável, tanto pelo público infantil como pelos pais (LOPES et al, 2012, apud, SILVA 2000).

A vacina inativada é utilizada para imunizar adultos que não foram imunizados quando criança pela Sabin, pois esta pode causar uma poliomielite imune à própria vacina em adultos. O vírus é inativado com o formaldeído e pode ficar armazenado na geladeira durante dois anos. Não há reversão de virulência, porém, causa inflamação no local da inoculação da vacina como efeito colateral (INFORMAÇÃO ORAL⁷).

4.3 – PRODUÇÃO DA VACINA

A produção da Vacina Oral contra a Poliomielite (VOP) é uma produção limpa, de baixo custo e segura, seguindo padrões pré-estabelecidos, respeitando as Boas Práticas Para Fabricação de Medicamentos (ANVISA, 2003).

Sua produção utiliza a Célula Vero como substrato inicial para o isolamento do poliovírus (SANTOS, 2008). Na Pasteur Merieux Connaught (Instituto Pasteur) a Célula Vero vem sendo usada desde 1982 na produção da vacina oral (MONTAGON; VINCENT-FALQUET; SALUZZO, 1999).

A Vacina Oral é produzida tendo como componentes os três sorotipos atenuados do poliovírus e cloreto de magnésio ($MgCl_2$), que assegura a estabilidade da vacina em altas temperaturas (PLOTKIN E EDWARD, 1972). A concentração de partículas virais de cada sorotipo presente na vacina está em 1.000.000 DICIT⁸ 50 para o poliovírus tipo I, 100.000 DICIT 50 para o tipo II e 600.000 DICIT 50 para o tipo três (www.vacinas.org).

O $MgCl_2$ é o principal responsável pela estabilidade da vacina em temperaturas de até 50°C, sem perder sua eficácia, podendo ficar sem refrigeração durante um determinado tempo. O pH da vacina estabilizada deve se manter entre 6.4 a 6.8 (PLOTKIN E EDWARD, 1972).

5 – CÉLULA VERO

5.1 - HISTÓRICO

⁷ Informações coletadas durante aula de Cultura de Células na Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio.

⁸ Dose infecciosa citopática. São as doses que podem infectar o tecido, nesse caso 50%.

A célula Vero (figura 10) é uma célula extraída do rim do Macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*) e transformada laboratorialmente pelos Japoneses Y. Yasumura e Y. Kawakita, em 27 de Março de 1962 na Chiba University no Japão, tornando-a uma célula imortal (SHEETS, 2000). Essa célula é sensível a arbovírus, SV-40, adenovírus de símios, poliovírus, entre outros. Foi utilizada inicialmente para produção de vacinas contra a poliomielite (SANTOS, 2008). E tem sido utilizada até hoje extensivamente em ensaios de placas e para replicação de vírus (SHEETS, 2000).

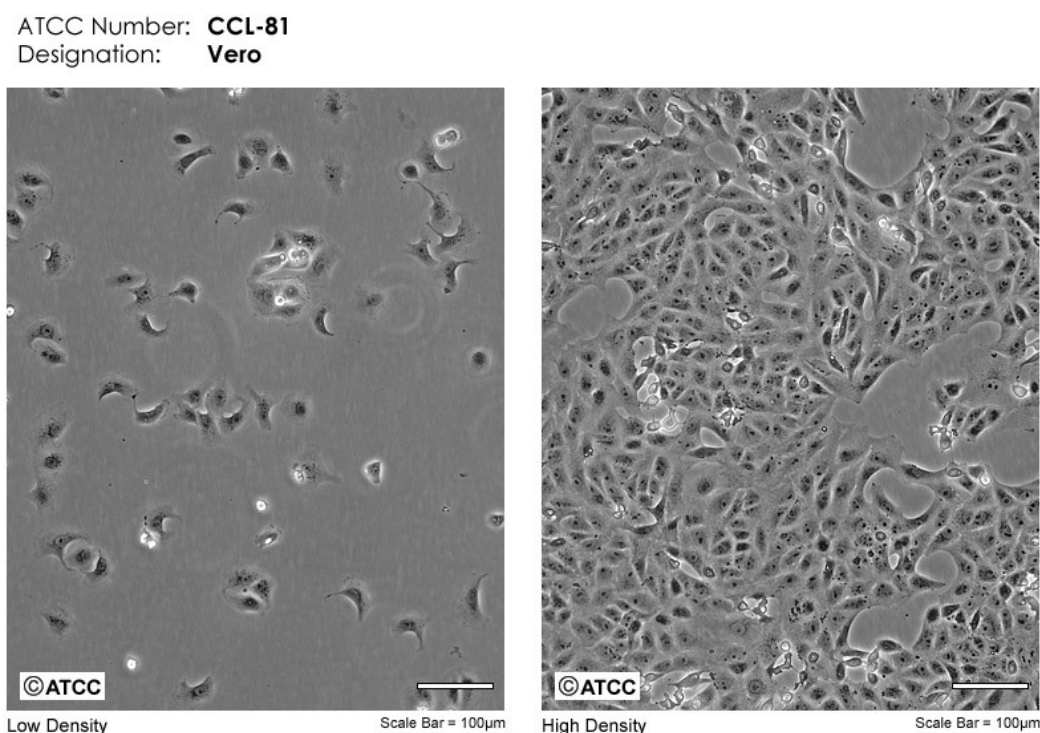


Figura 10 – Cultura de célula Vero.

Fonte: www.atcc.org.

As caracterizações iniciais da célula Vero como substrato para produção de vacina foram realizadas pelo Instituto Mérieux, atualmente conhecido como Aventis Pasteur (MONTAGON; VINCENT-FALQUET; SALUZZO, 1999). Este é licenciado para produzir a vacina com o poliovírus atenuado (VOP), a vacina com o vírus inativado (VIP) e a vacina contra a raiva utilizando célula Vero, desde a década de 1980 (SHEETS, 2000).

O motivo da utilização da célula Vero ao invés do uso de células primárias de macaco consiste no fato de que a célula Vero, por ser uma célula com características definidas, se torna mais facilmente um substrato (MONTAGON; VINCENT-FALQUET, 1998).

No caso de culturas de células recentemente inicializadas de macacos selvagens isso não é possível. Além do mais, o uso de animais em grande escala se torna complicado em questões éticas e econômicas. Devido às suas características de crescimento, a célula Vero é de fácil adaptação para o cultivo em biorreatores e fornece constante e alto rendimento de vírus (SHEETS, 2000). Porém, a cultura em células Vero também apresenta desvantagens. Por ser uma célula imortal. A célula Vero pode contaminar o indivíduo vacinado com a vacina com DNA alterado. Por esse motivo, é exigido que apenas 10 mg de DNA viral para cada mL de vacina.⁹

5.2 – CARACTERIZAÇÃO DA CÉLULA VERO

Quando se seleciona uma linhagem celular com características específicas há a necessidade de se estabelecer um padrão para o mesmo. Com esse objetivo, foram criados os bancos de células, que têm como funcionalidade facilitar a identificação, compra e venda dessas linhagens, assim como controlar o acesso a elas. Estes bancos de célula foram e ainda são criados em todos os continentes (PERES; CURIS, 2005).

A Célula Vero é uma célula de tecido epitelial, e seu crescimento em meio de cultura é aderente. É necessário que o banco de células Vero seja conservado em nitrogênio líquido para manter a sua viabilidade. Não deve ser armazenada em ambientes com temperaturas a -70°C, pois podem perder a sua viabilidade (ATCC).

Devido a essa limitação do banco de células e aos fatores contaminantes de um banco de células, é preciso avaliar o lote de células com a necessidade de saber sua autenticidade, logo, é imprescindível que seja feita a sua caracterização. Além do mais, a célula é um substrato importante na fabricação de vacinas, e, assim como todo o processo, a validade da célula também deve ser garantida para a fabricação de medicamentos (ANVISA, 2003).

Essas regras de boas práticas na fabricação de medicamentos estão inseridas na RDC 201, seguindo as leis nº 6.360, de 23 de setembro de 1976 e nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, e estabelecem as etapas de fabricação, assim como as normas de qualidade a serem seguidas (ANVISA, 2003)

⁹ Informações Orais.

5.2.1 – Testes Utilizados na Caracterização de Células

Grande parte dos testes utilizados na caracterização da célula Vero foram promulgados em documentos pelo Centro para Avaliação e Pesquisa Biológica (CBER)¹⁰ no *Points to Consider* (PTC)¹¹ ou pela Conferencia Internacional de Harmonização (IHC)¹² esses documentos recomendam que as linhagens de células utilizadas na produção de produtos biológicos sejam separados em diferentes bancos, e que cada um seja caracterizado pelas características de crescimento, identidade, doador, pureza e capacidade de criar tumores (SHEETS, 2000)

Os testes utilizados para caracterização de crescimento da célula Vero confirmam se o banco de células realmente é o que se supõe. Os testes são: tempo de replicação, aparência morfológica, passagem de nível e estabilidade em gene externo, se necessário. Os testes de identidade incluem a análise da isoenzima e a cariotipagem¹³ para confirmar a espécie, o gênero do doador e o número de cromossomos, que nesse caso é observado se a célula é diploide ou aneuploide¹⁴ (STANCEY et al, 1992).

O DNA fingerprinting é um teste utilizado que identifica a célula em estudo. Esse teste dará a certeza da linhagem da célula. (WEBB, DEBENHAM, 1991).

A pureza de um banco de células é dada quando não possui nenhum contaminante externo como contaminação por bactérias, fungos ou vírus e se está livre de micoplasma e de *Mycobacterium tuberculosis* (caso necessário), garantindo a esterilidade do banco de células. Para certificar-se que não há presença de micoplasma são feitos testes em caldo e ágar para micoplasmas possíveis de cultivar e indicador de cultura de células para micoplasmas não cultiváveis. O *Mycobacterium tuberculosis* pode ser detectado por cultura *in vivo* em porco sendo feitos seis testes por semana, além destes, também é possível a realização de PCR (SHEETS, 2000). Além dos testes em cultura, o ATCC indica o teste de Hoechst para a indicação de micoplasma, que emprega uma ligação de fluorocromo de DNA-binding (ATCC).

¹⁰ CBER: Centro que regulariza produtos biológicos para uso humano sob as leis federais

¹¹ PTC: Pontos a serem considerados em pesquisas biológicas.

¹² ICH: Organização da qual uniformiza a interpretação das diretrizes e requisitos técnicos para registro de produtos farmacêuticos em pesquisas e desenvolvimento de medicamentos

¹³ Cariotipagem: analisa a quantidade e a estrutura dos cromossomos em uma célula (de cariótipo: conjunto de cromossomos em uma célula).

¹⁴ Aneuploide: Quando o número de cromossomos da célula é alterado em comparação ao número de cromossomos normal da espécie

Existem diversos testes para identificação de vírus contaminantes na cultura de célula, tais quais detectam diferentes tipos de vírus. Estes testes podem ser *in vitro* (em cultura de tecido), *in vivo*, testes para produção de anticorpos, testes para retrovírus e testes para vírus específicos (SHEETS, 2000).

Os testes *in vitro* são recomendados por serem feitos adicionando-se o sobrenadante das células a serem testadas sobre culturas de monocamadas de células diploides humanas, células do rim e células da mesma espécie e tipo de tecido. No final do período de observação (normalmente duas semanas), as culturas são testadas por hemadsorção¹⁵ ou hemaglutinação¹⁶ usando hemácias de diversas espécies, incluindo de galinhas, porcos e humano (SHEETS, 2000).

Os testes *in vivo* são recomendados para serem feitos por injeção de fluidos de cultura ou células lisadas em camundongos adultos e recém-nascidos e em ovos de galinha embrionados. Os testes feitos em camundongos injetam um volume específico intracerebral e intraperitoneal com um terminal de sobrevivência durante o período de observação. O teste realizado com ovos embrionados envolve a injeção de um volume específico dentro do líquido alantoide ou na gema (SHEETS, 2000).

Os testes para retrovírus incluem microscopia eletrônica de transmissão (MET), transcriptase reversa e testes de infecção. A microscopia eletrônica de transmissão é um teste capaz de detectar contaminação grande em células contaminadas com vírus ou outros contaminantes. Os testes utilizando a transcriptase reversa incluem um teste convencional usando modelos de polinucleotídeo na presença de magnésio e manganês, ou testes de PCR, que são significativamente mais sensíveis (SHEETS, 2000).

Os testes para detecção de vírus específicos são feitos para os seguintes vírus: Epstein Barr, citomegalovírus, hepatite B e hepatite C, papilomavírus, adenovírus e Herpes vírus 6 e 7. Os testes são feitos utilizando PCR. Os testes para verificar a capacidade de criar tumores são feitas em espécies que contenham 10^7 células/animal (SHEETS, 2000).

5.2.2 – Identificação da Célula Vero

Os testes com a linhagem da célula Vero que confirmam sua autenticidade como aneuploide, incluem lactato desidrogenase, fosfo-gluconato desidrogenase e glicose fosfato

¹⁵ Hamadsorção: agregação de eritrócitos à superfície de células animais, em meio de cultura, após infecção por vírus (www.pdamed.com).

¹⁶ Hemaglutinação: agregação de eritrócitos por anticorpo ou vírus (www.pdamed.com).

isomerase. Essas análises isoenzimáticas confirmam que a célula Vero foi extraída do Macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*) e diferente de outras linhagens das quais derivam de tecidos humanos (SHEETS, 2000).

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

É possível concluir que a poliomielite é uma doença grave e que merece total atenção por parte da comunidade de saúde, mesmo após sua erradicação. É uma doença de fácil

disseminação, pois, uma vez infectando um indivíduo ela é transmitida facilmente por via oral-oral e oral-fecal, principalmente em crianças, ganhando grandes proporções em um espaço pequeno de tempo. Além do mais, a disseminação do vírus é facilitada por diversos fatores, são eles: seu tamanho, que por ser um vírus pequeno possui mais facilidade de propagação; o clima, pois sua disseminação se dá melhor em climas tropicais. Outro fato que torna a doença grave é o efeito colateral que ela apresenta, pois pode causar uma paralisia flácida dos membros inferiores, ou seja, uma deformação em um dos membros.

Pôde-se constatar que a disseminação da doença é facilitada em locais que não possuam acesso a saneamento básico e com grande população, vide que a epidemia tomou grandes proporções em meados do século XIX, século em que ocorreu um aumento populacional nos grandes centros urbanos e que o saneamento básico não era uma questão primordial. Esses fatos elevam a doença a um problema de saúde pública. Desde então a doença despertou interesses de vários cientistas, tendo diferentes estudos sobre ela e cada vez mais atualizados. A doença se manteve em alta incidência até meados da década de 1980, quando Albert Sabin promove um programa de vacinação em massa com a vacina oral contra a poliomielite (VOP).

A VOP foi de total importância na erradicação da doença, pois, além de conter os três sorotipos da doença, é uma vacina de fácil administração em seu público alvo, ou seja, crianças, ganhando grande aceitação por parte delas e até de seus responsáveis. Além do mais, a vacina proporciona a imunização passiva do ambiente e das pessoas de convívio direto com a criança vacinada, esse fator foi de grande importância uma vez que foi responsável pela imunização em grande parte da população. Contudo, alguns fatores inviabilizam a sua utilização e, nesses casos, é utilizada a vacina Salk, uma vacina alternativa no programa de erradicação da doença.

Também foi possível concluir que a produção da vacina da poliomielite utilizando a célula Vero se mostra eficaz e de grande importância em todos os sentidos.

É uma produção limpa, segura e, principalmente, de baixo custo, fator que auxilia na grande produção e distribuição da vacina, podendo ser distribuída mundialmente em quantidades necessárias para a vacinação de toda a população. A produção é feita com os três sorotipos da vacina, assim, a imunização se dá mais completa, uma vez que o indivíduo cria imunidade para diferentes sorotipos, adquirindo total segurança contra a contaminação.

A utilização das células Vero na produção da vacina oral é de grande importância, pois ela possui grande crescimento em diferentes meios e apresenta características de crescimento

que possibilitam a fácil adaptação em biorreatores e alto rendimento de produção. Além do mais, a utilização de um meio de cultura de células na produção da vacina é viável, pois apresenta características fixas e definidas tornando um substrato, o que seria impossível em células recém iniciadas de macacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SLATER & SLATER, Great. Time Magazine 100, **The Century Greatest Minds**. March 29, 1999. Jewish Men. Jonas Salk, pág. 267 M. Shapiro, The Jewish 100. pág. 286.

JOHN, T.J. **International Encyclopedia of Public Health**, 2008, Pages 144-154.

I. PLOTKIN, Stanley A., 1972 – II. Mortimer, EDWARD A., Jr., **Vaccines**, 1932. W.B. Saunders Company.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Curso Básico de Vigilância Epidemiológica. Módulo III** Vigilância Epidemiológica de Doenças, Unidade: Poliomielite. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde – SNABS. Divisão Nacional de Epidemiologia – DNE / Grupo Executivo do Plano para a Erradicação de Poliomielite. Escola Nacional de Saúde Pública – Fundação Oswaldo Cruz (ENSP/FIOCRUZ). Ministério da Saúde, 1988.

FIOCRUZ, Fundação Oswaldo Cruz. **Memória da poliomielite: acervos de depoimentos orais.** / [organização de] Anna Beatriz de Sá Almeida, Dilene Raimundo do Nascimento, Laurinda Rosa Maciel. – Rio de Janeiro, Fiocruz, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância dos eventos adversos pós-vacinação: cartilha para trabalhadores de sala de vacinação – Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

BRASIL. **Guia de vigilância epidemiológica** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 6. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

www.fda.gov – acessado em 22/10/2012.

<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/poliomielite/poliomielite-9.php> - acessado em 21/05/2012.

MAMPTON, Lee. **Albert Sabin and the Coalition to Eliminate Polio From the Americas.** *American Journal of Public Health*. January 2009, Vol 99, No. 1. P.p.: 34 – 44.

SHEETS, Rebecca. **History and Characterization of the Vero Cell Line.** May 12, 2000.

www.atcc.org – acessado em 14/10/2012.

MONTAGNON, B.J.; VINCENT-FALQUET, J.C. **Experience with Vero Cells at Pasteur Mérieux Connaught. Pasteur Mérieux.** Developments in Biological Standardization, 1999, vol 98, pp 137-140.

www.ich.org – acessado em 22/10/2012.

MONTAGNON, B.J.; VINCENT-FALQUET, J.C; SALUZZO, J.F. **Experience with Vero Cells Line.** Developments in Biological Standardization, 1998, vol 93, pp 119-123.

<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-81&Template=cellBiology> – acessado em 15/10/2012.

LIN, Ya-Ching; WU, Cheng-Nan; SHIH, Shin-Ru, HO, Mei-Shang. **Characterization of a Vero cell-adapted virulent strain of enterovirus 71 suitable for use as a vaccine candidate.** March 2002.

SILVA, Daniele Garcia de Almeida. **Programa de imunização infantil em Umuarama-PR: um estudo dos fatores associados a atrasos de vacinação / Daniele Garcia de Almeida Silva** – 2010.

www.pdamed.com – acessado em 22/10/2012.

SANTOS, Norma Suely de Oliveira. **Introdução a Virologia Humana.** Guanabara Koogan. 2ª Edição, 2008.

LOPES, Louise Santos; COSTA, Rosane Lopes da; LIMA, Júlia Leite; FARIAS, Alexandre Pinto da; SOUZA, Wbiratan de Lima. **Vacina Oral contra a poliomielite versus Vacina Injetável: Uma mudança necessária contra a poliomielite no Brasil.** *Caderno de Graduação – Ciências Biológicas e da Saúde Fits/ Maceió/ v.1/ n.1/ p. 43 – 53/ nov. 2012.*

PERES, Carmem Maldonado; CURI, Rui. **Como Cultivar Células.** Guanabara Koogan. 1ª Edição, 2005.

C. Meyer, ed. sc., 2012, **Dicionário de Ciências Animais**. [Em linha]. Montpellier, França, CIRAD.[2012/12/12]. <URL: [Http://dico-sciences-animales.cirad.fr/](http://dico-sciences-animales.cirad.fr/)>

WEBB, M. B. T.; DEBENHAM, P. G. **Cell Line Characterisation by DNA fingerprinting; A Review**. Continuous Cell Lines – An International Workshop on Current Issues Bethesda, MD, USA, 1991. Develop. Biol. Standard., Vol. 76, pp. 39-42 (Karger, Basel, 1992).

STANCEY, Glyn N.; BOLTON, Bryan J.; DOYLE, Alan. **DNA fingerprinting transforms the art of cell authentication**. Nature. Vol. 357. 21 May. 1992.