

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

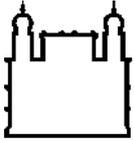
Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**ANÁLISES DE ESTUDOS CLÍNICOS COM VACINAS REALIZADOS NO ÂMBITO DO INSTITUTO
OSWALDO CRUZ E FIOCRUZ – MEMÓRIA, AVALIAÇÃO E LIÇÕES**

REINALDO DE MENEZES MARTINS

Rio de Janeiro

21 de março de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

REINALDO DE MENEZES MARTINS

**ANÁLISES DE ESTUDOS CLÍNICOS COM VACINAS REALIZADOS NO ÂMBITO DO INSTITUTO
OSWALDO CRUZ E FIOCRUZ – MEMÓRIA, AVALIAÇÃO E LIÇÕES**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Medicina Tropical

Orientador: Prof. Dr. José Rodrigues Coura

RIO DE JANEIRO

21 de março de 2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M379 Martins, Reinaldo de Menezes

Análises de estudos clínicos com vacinas realizados no âmbito do Instituto Oswaldo Cruz e Fiocruz – memória, avaliação e lições / Reinaldo de Menezes Martins. – Rio de Janeiro, 2014.

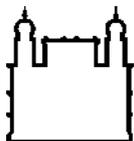
xxvi, 310 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2014.

Bibliografia: f. 255-273

1. Estudos clínicos. 2. Vacinas. 3. Métodos. 4. Ética. 5. Avaliação

CDD 615.372



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: REINALDO DE MENEZES MARTINS

**ANÁLISES DE ESTUDOS CLÍNICOS COM VACINAS REALIZADOS NO ÂMBITO DO INSTITUTO
OSWALDO CRUZ E FIOCRUZ – MEMÓRIA, AVALIAÇÃO E LIÇÕES**

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Rodrigues Coura

Aprovada em: 21/03/2014

EXAMINADORES:

Martha Cecilia Suárez-Mutiz (Revisora)

Akira Homma (Presidente)

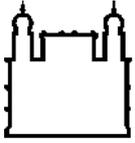
Gabriel Wolf Oselka

Luiz Antonio Bastos Camacho

Marilda Mendonça Siqueira

Jaime Larry Benchimol

Rio de Janeiro, 21 de março de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Dedicatória

Aos meus antepassados, que me deram a vida e os exemplos de trabalho e integridade.

Aos meus pais, meus irmãos, minha esposa Neuza, meus filhos Marília e Flávio, meus netinhos Rafael e Frederico, e todos os demais queridos.

Aos que me ensinaram.

Aos meus colegas de trabalho.

Aos voluntários dos estudos clínicos.

Aos que me sucederem, na expectativa de que esse trabalho lhes seja útil e inspirador.

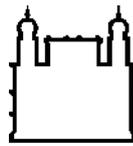
AGRADECIMENTOS

A Bio-Manguinhos, Fiocruz, e ao Departamento de Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, pelas oportunidades que me deram.

Aos colegas que me ajudaram, em especial ao Dr. Akira Homma, pessoa de rara visão de futuro, que me incentivou desde o primeiro dia que cheguei a Bio-Manguinhos, e a Luiz Antonio Bastos Camacho, pela colaboração generosa e competente aos estudos clínicos que tive a honra de conduzir.

Aos colegas e amigos da Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos e das demais unidades da Fiocruz.

**“Se vi mais longe é porque eu estava no ombro de gigantes”
Isaac Newton**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ANÁLISES DE ESTUDOS CLÍNICOS COM VACINAS REALIZADOS NO ÂMBITO DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ E FIOCRUZ – MEMÓRIA, AVALIAÇÃO E LIÇÕES

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Reinaldo de Menezes Martins

Após revisão sistemática da literatura, e outras formas de busca, foram revisados sessenta e um estudos clínicos com vacinas realizados no âmbito da Fundação Oswaldo Cruz: explicam-se os critérios de seleção, metodologia, os contextos de cada um, apresentam-se os resumos dos trabalhos, com comentários, uma análise do conjunto dos trabalhos, faz-se uma discussão final, extraem-se conclusões e são feitas sugestões e propostas para o futuro. Os estudos foram realizados de acordo com os preceitos éticos e com sólida metodologia científica, se bem que os aspectos éticos e metodológicos foram aperfeiçoados e formalizados ao longo do tempo. Todos se destinaram a resolver problemas de saúde relevantes para o país e são notáveis no seu conjunto. O número de estudos, para um período que se estende por cerca de 76 anos, desde o primeiro estudo clínico com vacinas até 2013, é relativamente pequeno para uma instituição com o porte e responsabilidades da Fiocruz. O Autor dessa tese foi primeiro autor de três dessas pesquisas, uma das quais publicada em revista internacional de alto impacto na vigência de elaboração dessa tese, e co-autor de quatro outras, todas publicadas em revistas internacionais indexadas. Na segunda parte da tese, com um critério de inclusão mais amplo, o autor da tese apresenta oito pesquisas com vacinas das quais foi primeiro autor, publicadas em revistas indexadas nacionais e internacionais ou Anais de congressos internacionais especializados. Apesar de progressos recentes, sugere-se a criação de novas formas de organização institucional na Fiocruz e em Bio-Manguinhos, visando melhor operacionalização dos estudos clínicos e acelerar o desenvolvimento tecnológico.

Palavras-chave: Estudos clínicos, vacinas, métodos, ética, avaliação



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ANALYSIS OF CLINICAL STUDIES WITH VACCINES UNDER THE SCOPE OF INSTITUTO OSWALDO CRUZ AND FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – MEMORY, EVALUATION AND LESSONS

ABSTRACT

THESIS FOR DOCTORATE DEGREE IN TROPICAL MEDICINE

Reinaldo de Menezes Martins

After systematic review of literature, and other search approaches, sixty one clinical studies with vaccines which have been done within Fiocruz scope were reviewed: selection criteria, methodology, contexts related to each one of them are explained, summaries are presented and commented, as well as an analysis of all studies taken together. A final discussion closes the clinical studies evaluation, following with conclusions, suggestions and proposals for the future. All studies have been done according to ethical tenets and with solid scientific methodology, although ethical and methodological issues have been improved and formalized along the period. All studies have been done to solve health problems relevant to the country and are an outstanding accomplishment on the whole. The author was first author in three of these studies, one of them published in an internacional journal of high impact during the elaboration of this thesis, and co-author in four other studies, all published in indexed international journals. On the thesis second part, with a more inclusive criteria, the author presents eight researches on vaccines as first author, published in indexed national and international journals, or Annals of specialized international congresses. The number of studies, for a period that extends for about 76 years, from the first clinical study until 2013, is relatively small for an institution with the size and responsibilities of Fiocruz. Although a progress is observed in recent years, a new institutional model is proposed for Bio-Manguinhos and Fiocruz, as well as the strengthening of cooperative and integrative activities, in order to streamline procedures and to speed up technological development.

Key words: Clinical studies, vaccines, methods, ethics, evaluation

ÍNDICE

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O que são o Instituto Oswaldo Cruz, a Fiocruz e Bio-Manguinhos.	1
1.2. O que é o Programa Nacional de Imunizações	8
1.3. Etapas do desenvolvimento tecnológico em vacinas: da bancada ao Centro de Saúde.	10
1.4. A legislação internacional sobre pesquisa clínica	13
1.5. A legislação brasileira sobre pesquisa clínica.....	14
1.6. As Organizações Representativas de Pesquisa Clínica.....	16
1.7. A Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos/Fiocruz.....	16
1.8. As Redes de Pesquisa Clínica.....	16
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	19
PRIMEIRA PARTE – REVISÃO SISTEMÁTICA DOS ESTUDOS CLÍNICOS.....	21
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo geral.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
3.2.1. Recuperar e ordenar os estudos clínicos já realizados no âmbito da Fiocruz.	23
3.2.2. Contextualizar cada um dos estudos clínicos, apresentar um resumo dos principais achados de cada estudo clínico e comentá-los.....	23
3.2.3. Analisar todos os estudos clínicos em seu conjunto.....	23
3.2.4. Extrair ensinamentos e conclusões.....	23
3.2.5. Propor medidas que incrementem o aproveitamento de oportunidades para a realização de estudos clínicos inovadores.	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
5. RESULTADOS	31
5.1. Estudos clínicos com a vacina de febre amarela.....	31
5.1.1. Soper FL, Smith HH 1938. Yellow fever vaccination with cultivated virus and immune and hyperimmune serum. <i>American Journal of Tropical Medicine and Hygiene</i> 18:111-134.	32
5.1.2. Smith HH, Penna HA, Paoliello A 1938. Yellow fever vaccination with cultured virus (17D) without immune serum. <i>Am J Trop Med Hyg</i> 18:437-468.	33
5.1.3. Fox JP, Manso C, Penna HA, Pará M 1942. Observations on the occurrence of icterus in Brazil following vaccination against yellow fever. <i>Am J Hyg</i> 36:68-116.....	39
5.1.4. Fox JP, Kossobudzki SL, Cunha JF 1943. Field studies on the immune response to 17D yellow fever virus. <i>Am J Hyg</i> 38:113-138.....	42

5.1.5. Fox JP, Lennette EH, Manso C, Aguiar JRS 1942. Encephalitis in man following vaccination with 17D yellow fever virus. <i>Am J Hyg</i> 36:117-142.	44
5.1.6. Fox JP, Cabral AS 1943. The duration of immunity following vaccination with the 17D strain of yellow fever virus. <i>Am J Hyg</i> 37:93-120.	46
5.1.7. Fox JP, Cunha JF, Kossobudzki SL 1948. Additional observations on the duration of immunity following vaccination with the 17D strain of yellow fever virus. <i>Am J Hyg</i> 47:64-70.	48
5.1.8. Groot H, Ribeiro RB 1962. Neutralizing and haemagglutination-inhibiting antibodies to yellow fever 17 years after vaccination with 17D vaccine. <i>Bull Wld Hlth Org</i> 27:699-707. Pouso Alegre, 1958.	49
5.1.9. Lopes OS, Guimarães SSSA, Carvalho R 1988. Studies on yellow fever vaccine III – dose response in volunteers. <i>J Biol Stand</i> 16:77-82.....	50
5.1.10. Stefano I, Sato HK, Pannuti CS, Omoto TM, Mann G, Freire MS, Yamamura A MY, Vasconcelos PFC, Oselka GW, Weckx LW, Salgado MF, Noale LFO, Souza VAUF 1999. Recent immunization against measles does not interfere with the sero-response to yellow fever vaccine. <i>Vaccine</i> 17:1042-1046.....	53
5.1.11. Freire MS, Carvalho R, Yamamura AMY, Almeida LFC, Santos HHL, Borges MBJ, Mann GF 2002. Seroconversion following vaccination with the 17DD substrain of yellow fever virus. <i>Virus Reviews and Research</i> 7:51-56.....	55
5.1.12. Camacho LAB, Freire MS, Leal MLF, Aguiar SG, Nascimento JP, Iguchi T, Lozana JA, Farias RHG, e Grupo Colaborativo para o estudo das Vacinas de Febre Amarela 2004. Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17DD yellow fever vaccines: a randomized trial. <i>Rev Saúde Pública</i> 38:671-678.....	56
5.1.13. Camacho LAB, Aguiar SG, Nascimento JP, Freire MS, Leal MLF, Iguchi T, Lozana JA, Farias RHG, e Grupo Colaborativo para o estudo das Vacinas de Febre Amarela 2005. Reactogenicity of yellow fever vaccines in a randomized, placebo-controlled trial. <i>Rev Saúde Pública</i> 39:413-420.	60
5.1.14. Melo AB, Silva MPC, Magalhães MCF, Gil LHV, Carvalho EMF, Braga-Neto UM, Bertani GR, Marques Jr ETA, Cordeiro MT 2011. Description of a Prospective 17DD yellow fever vaccine cohort in Recife, Brazil. <i>Am J Trop Med Hyg</i> 2011; 85:4, 739-747.....	62
5.1.15. Silva JRN, Camacho LAB, Siqueira MM, Freire M, Castro YP, Maia MLS, Yamamura AMY, Martins RM, Leal MLF, e Grupo Colaborativo para o Estudo das Vacinas de Febre Amarela 2011. Mutual interference on the immune response to yellow fever vaccine and a combined vaccine against measles, mumps and rubella. <i>Vaccine</i> 29:6327-6334.	65
5.1.16. Martins RM, Maia MLS, Farias RHG, Camacho LAB, Freire MS, Galler R, Yamamura AMY, Almeida LFC, Lima SMB, Nogueira RMR, Sá GRS, Hokama DA, Carvalho R, Freire RAV, Pereira Filho E, Leal MLF, Homma A 2013b. 17DD yellow fever vaccine. A double blind, randomized clinical trial of immunogenicity and safety on a dose-response study. <i>Hum Vaccin Immunother</i> 9:1-10.....	68
Estudos imunológicos com a vacina de febre amarela	71
Pequeno glossário de termos imunológicos	71
5.1.17. Santos AP, Bertho AL, Dias DC, Santos JR, Marcovistz R 2005. Lymphocyte subset analyses in healthy adults vaccinated with yellow fever 17DD virus. <i>Mem Inst Oswaldo Cruz</i> 100:331-337.	77

5.1.18. Santos AP, Bertho AL, Martins RM, Marcovistz R 2007. The sample processing time interval as an influential factor in flow cytometry analysis of lymphocyte subsets. <i>Mem Inst Oswaldo Cruz</i> 102:117-120.	79
5.1.19. Martins MA, Silva ML, Marciano APV, Peruhype-Magalhães V, Eloi-Santos SM, Ribeiro JGL, Correa-Oliveira R, Homma A, Kroon EG, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho AO 2007. Activation/Modulation of adaptive immunity emerges simultaneously after 17DD yellow fever first-time vaccination: is this the key to prevent severe adverse reactions following immunization? <i>Clin Exp Immunol</i> 148:90-100.....	80
5.1.20. Santos AP, Matos DCS, Bertho AL, Mendonça SCF, Marcovistz R 2008. Detection of T _H 1/ T _H 2 cytokine signatures in yellow fever 17DD first-time vaccinees through ELISpot assay. <i>Cytokine</i> 42:152-155.....	82
5.1.21. Martins MA, Silva ML, Elói-Santos SM, Ribeiro JGL, Peruhype-Magalhães V, Marciano APV, Homma A, Kroon EG, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA 2008. Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination. <i>Vaccine</i> 26:1173-1184.....	83
5.1.22. Neves PCC, Matos DCS, Marcovistz R, Galler R 2009. TLR expression and NK activation after human yellow fever vaccination. <i>Vaccine</i> 27:5543-5549.....	85
5.1.23. Luiza-Silva M, Martins MA, Espírito-Santo LR, Campi-Azevedo AC, Silveira-Lemos D, Ribeiro JGL, Homma A, Kroon EG, Teixeira-Carvalho A, Eloi-Santos SM, Martins-Filho OA 2011. Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. <i>Vaccine</i> 29:583-592.	87
5.1.24. Luiza-Silva M, Campi-Azevedo AC, Batista MA, Martins MA, Avelar RS, Lemos DS, Camacho LAB, Martins RM, Maia MLS, Farias RHG, Freire MS, Galler R, Homma A, Ribeiro JGL, Lemos JAC, Martins MA, Eloi-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA 2011. Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody. <i>J Infect Dis</i> 204:873-883.....	90
5.1.25. Campi-Azevedo AC, Araujo-Porto LP, Luiza-Silva M, Batista MA, Martins MA, Sathler-Avelar R, Silveira-Lemos D, Camacho LAB, Martins RM, Maia MLS, Farias R H G, Freire MS, Galler R, Homma A, Ribeiro JGL, Lemos JAC, Auxiliadora-Martins M, Caldas IR, Elói-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho O 2012. 17DD and 17D-213/77 yellow fever substrains trigger a balanced cytokine profile in primary vaccinated children. <i>PLoS one</i> 7:1-11.	92
5.1.26. Melo AB, Nascimento EJM, Braga-Neto U, Dhalia R, Silva AM, Oelke M, Schneck JP, Sidney J, Sette A, Montenegro SML, Marques E T 2013. T-cell memory responses elicited by yellow fever vaccine are targeted to overlapping epitopes containing multiple HLA-I and –II binding motifs. <i>PLoS Neglected Tropical Diseases</i> 7:1-11.	94
5.1.27. Comentários finais sobre os estudos com a vacina de febre amarela.....	97
5.2. Estudos clínicos com a vacina de sarampo.	103
5.2.1. Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Bermudez JAZ, Pinhão AT, Queiroz B, Venâncio LR, Assis CER, Shiraiwa T 1982. Serological response to measles vaccine (Schwarz strain) in a low-income population at Rio de Janeiro. <i>Rev Microbiol São Paulo</i> 13 (3):242-243.....	103
5.2.2. Oliva OP, Chaves JRS, Loureiro MLP, Pereira LA, Homma A 1986. Vacina CAM-70 contra o sarampo, produzida no Brasil. Avaliações de campo em crianças com 6 -12 meses	

de idade. <i>Boletim Epidemiológico, Ministério da Saúde, Fundação SESP, ano XVIII nº 21/26</i> , p. 121-129.....	104
5.2.3. Camacho LA, Freire MS, Yamamura AMY, Leal ML, Mann G 2000. Estudo de soroconversão com formulações da vacina Biken CAM-70 contra sarampo. <i>Rev Saúde Pública 34:358-366</i>	108
5.2.4. Lindgren-Alves CR, Freire LMS, Oliveira RC, Guerra HL, Da-Silva EE, Siqueira MM, Horta IM, Queiroz CC 2001. Pesquisa de anticorpos contra o sarampo em crianças infectadas pelo HIV, após imunização básica. <i>Jornal de Pediatria 77:496-502</i>	111
5.3. Estudos clínicos com a vacina de poliomielite	113
5.3.1. Schatzmayr HG, Homma A 1969. Avaliação sorológica da vacina oral, tipo Sabin, contra a poliomielite, em região semi-rural: I. Formação de anticorpos em vacinados. <i>Rev Soc Bras Med Trop 3:317-322</i>	113
5.3.2. Schatzmayr HG, Maurice Y, Fujita M, Fillipis AMB 1986. Serological evaluation of poliomyelitis oral and inactivated vaccines in an urban low-income population at Rio de Janeiro, Brazil. <i>Vaccine 4:111-113</i>	116
5.3.3. Patriarca PA, Palmeira G, Lima Filho J, Cordeiro MT, Laender F, Oliveira MJC, Dantes MCS, Risi Jr JB 1988. Randomised Trial of alternative formulations of oral poliovaccine in Brazil. <i>Lancet 27:429-432</i>	118
5.3.4. Comentários finais sobre os estudos com a vacina de poliomielite	121
5.4. Estudos clínicos com a vacina BCG.....	125
5.4.1. Camacho LAB, Klein CH 1990. Risco de infecção tuberculosa entre escolares com alta cobertura pelo BCG. <i>Bol Of Sanit Panam 108:100-112</i>	125
5.4.2. Barbosa T, Arruda S, Fernandes BD, Carvalho LP, Cardoso S, Cunha S, Barreto ML, Pereira SM, Rodrigues LC, Barral-Netto M 2003. BCG (Bacille of Calmette-Guérin) revaccination leads to improved in vitro IFN- γ response to mycobacterial antigen independent of tuberculin sensitization in Brazilian school-age children. <i>Vaccine 21:2152-2160</i>	127
5.4.3. Oliveira ES, Marinho JM, Barbosa T 2013. Interferon-gamma production by mononuclear cells in Bacille Calmette-Guérin-revaccinated healthy volunteers predicted long-term antimycobacterial responses in a randomized controlled trial. <i>Vaccine 31:3778-3782</i>	129
5.5. Estudos clínicos com a vacina contra hepatite B	131
5.5.1. Motta MSF, Mussi-Pinhata MM, Jorge SM, Yoshida CFT, Souza CBS 2002. Immunogenicity of hepatitis B vaccine in preterm and full term infants vaccinated within the first week of life. <i>Vaccine 20:1557-1562</i>	131
5.5.2. Martins RM, Bensabath G, Arraes LC, Oliveira MLA, Miguel JC, Barbosa G, Camacho LAB 2004. Multicenter study on the immunogenicity and safety of two recombinant vaccines against hepatitis B. <i>Mem Inst Oswaldo Cruz 99:865-871</i>	132
5.5.3. Luna EJ, Moraes JC, Silveira L, Salina HSN 2009. Efficacy and safety of the Brazilian vaccine against Hepatitis B in newborns. <i>Rev Saúde Pública 43:1-6</i>	134
5.5.4. Motta-Castro ARC, Gomes SA, Yoshida CFT, Miguel JC, Teles SA, Martins RMB 2009. Compliance with and response to hepatitis B vaccination in remaining quilombo communities in Central Brazil. <i>Cad Saude Pública 25:738-742</i>	135
5.5.5. Moraes JC, Luna EJA, Grimaldi RA 2010. Immunogenicity of the Brazilian hepatitis B vaccine in adults. <i>Rev Saúde Pública 44:1-5</i>	136

5.5.6. Potsch DV, Oliveira MLA, Giniúno C, Miguel JC, Oliveira SAN, Silva EF, Moreira RB, Cruz GVM, Oliveira ALVSM, Camacho LAB, Barroso PF 2010. High rates of serological response to a modified hepatitis B vaccination schedule in HIV-infected adults subjects. <i>Vaccine</i> 28:1447-1450.	138
5.5.7. Potsch DV, Camacho LAB, Tuboi S, Villar LM, Miguel JC, Giniúno C, Silva EF, Mendonça RMM, Moreira RB, Barroso PF 2012. Vaccination against hepatitis B with 4-double doses increases response rates and antibodies titers in HIV-infected adults. <i>Vaccine</i> 30:5973-5977.	140
5.6. Estudos clínicos com a vacina tetravalente DTP/Hib	143
5.6.1. Clemens SA, Azevedo T, Homma A 2003. Feasibility study of the immunogenicity and safety of a novel DTPw/Hib (PRP-T) Brazilian combination compared to a licensed vaccine in healthy children at 2, 4, and 6 months of age. <i>Rev Soc Bras Med Trop</i> 36:321-330.	143
5.6.2. Martins RM, Camacho LAB, Marcovistz R, Noronha TG, Maia MLS, Santos EM, Barbosa GG, Silva AMV, Souza PCNF, Lemos MCF, Homma A 2008. Immunogenicity, reactogenicity and consistency of production of a Brazilian combined vaccine against diphtheria, tetanus, pertussis and <i>Haemophilus influenzae</i> type b. <i>Mem Inst Oswaldo Cruz</i> 103:711-718.	145
5.6.3. Matos DCS, Silva AMV, Neves PCC, Martins RM, Homma A, Marcovistz R 2009. Pattern of functional antibody activity against <i>Haemophilus influenzae</i> type b (Hib) in infants immunized with diphtheria-tetanus-pertussis/Hib Brazilian combination vaccine. <i>Braz J Med Biol Res</i> 42:1242-1247.	147
5.7. Estudo clínico com a vacina tríplice viral	149
5.7.1. Boaventura AS, Stralioto SM, Siqueira MM, Ranieri TS, Bercini M, Schermann MT, Wagner MB, Silveira TR 2006. Prevalence of antibodies against measles, mumps, and rubella before and after vaccination of school-age children with three different triple combined viral vaccines, Rio Grande do Sul, Brazil, 1996. <i>Rev Panam Salud Publica</i> 20:299-306.	149
5.8. Estudos clínicos com a vacina de rotavírus	153
5.8.1. Mascarenhas JDP, Linhares AC, Gabbay YB, Leite JPG 2002a. Detection and characterization of rotavírus G and P types from children participating in a rotavirus vaccine trial in Belém, Brazil. <i>Mem Inst Oswaldo Cruz</i> 97:113-117.	153
5.8.2. Mascarenhas JDP, Leite JPG, Gabbay YB, Freitas RB, Oliveira CS, Monteiro TAF, Linhares AC, 2002b. Rotavirus G serotypes and P[,G genotypes identified in cases of reinfection among children participating in a trial with rhesus-human reassortant tetravalent vaccine (RRV-TV) in Belém, Brazil. <i>J Trop Ped</i> 2002; 48:93-97.	155
5.9. Estudo clínico com a vacina de influenza	157
5.9.1. Santini-Oliveira M, Camacho LAB, Souza TML, Luz PM, Vasconcellos MTL, Giacoia-Gripp CBW, Morgado MG, Nunes EP, Lemos AS, Ferreira ACG, Moreira RI, Veloso VG, Siqueira MM, Grinsztejn B 2012. H1N1pdm09 adjuvanted vaccination in HIV-infected adults: a randomized trial of two single versus two double doses. <i>PLoS One</i> 7:1-11.	157
5.10. Estudos clínicos com a vacina de papiloma	159
5.10.1. Giuliano AR, Palefsky JM, Goldstone S, Moreira Jr ED, Penny ME, Aranda C, Vardas E, Moi H, Jessen H, Hillman R, Chang Y, Ferris D, Rouleau D, Bryan J, Marshall JB, Vuocolo S, Barra E, Radley D, Haupt RM, Guris D 2011. Efficacy of quadrivalent HPV vaccine against HPV infection and disease in males. <i>New Eng J Med</i> 354:401-411.	159

5.10.2. Moreira Jr ED, Palefsky JM, Giuliano AR, Goldstone S, Aranda C, Jessen H, Hillman RJ, Ferris D, Coutlee F, Vardas E, Marshall JB, Vuocolo S, Haupt RM, Guris D, Garner EIO 2011. Safety and reactogenicity of a quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) L1 viral-like-particle vaccine in older adolescents and young adults. <i>Human Vaccines</i> 7:768-775.	162
5.10.3. Palefsky JM, Giuliano AR, Goldstone S, Moreira Jr ED, Aranda C, Jessen H, Hillman R, Ferris D, Coutlee F, Stoler MH, Marshall JB, Radley D, Vuocolo S, Haupt RM, Guris D, Garner EIO 2011. HPV vaccine against anal HPV infection and anal intraepithelial neoplasia. <i>N Engl J Med</i> 365:1576-1585.	164
5.10.4. Hillman RJ, Giuliano AR, Palefsky JM, Goldstone S, Moreira Jr ED, Vardas E, Aranda C, Jessen H, Ferris DG, Coutlee F, Marshall JB, Vuocolo S, Haupt RM, Guris D, Garner EIO 2012. Immunogenicity of the quadrivalent human papillomavirus (type 6/11/16/18) vaccine in males 16 to 26 years old. <i>Clin Vacc Immunol</i> 19:261-267.....	166
5.11. Estudos clínicos com a vacina de malária	169
5.11.1. Urdaneta M, Prata A, Struchiner CJ, Tosta CE, Tauil P, Boulos M 1996. Safety evaluation of SPf66 malaria vaccine in Brazil. <i>Rev Soc Bras Med Trop</i> 29:497-501.....	169
5.11.2. Urdaneta M, Prata A, Struchiner CJ, Tosta CE, Tauil P, Boulos M 1998. Evaluation of SPf66 malária vaccine efficacy in Brazil. <i>Am J Trop Med Hyg</i> 58:378-385	171
5.12. Estudos clínicos com vacinas de <i>Leishmania</i>	173
5.12.1. Mendonça SCF, De Luca PM, Mayrink W, Restom TG, Conceição-Silva F, Da-Cruz AM, Bertho AL, Costa CA, Genaro O, Toledo VPCP, Coutinho SG 1995. Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. <i>Am J Trop Med Hyg</i> 53:195-201.....	173
5.12.2. Marzochi KBF, Marzochi MCA, Silva AF, Grativol N, Duarte R, Confort EM, Modabber F 1998. Phase 1 study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. <i>Mem Inst Oswaldo Cruz</i> 93:205-212.....	175
5.12.3. De Luca PM, Mayrink W, Alves CR, Coutinho SG, Oliveira MP, Bertho AL, Toledo VP, Costa CA, Genaro O, Mendonça CF 1999. Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. <i>Vaccine</i> 17:1179-1185.	177
5.12.4. De Luca PM, Mayrink W, Pinto JA, Coutinho SG, Santiago MA, Toledo VP, Costa CA, Genaro O, Reis AB, Mendonça SCF 2001. A randomized double-blind placebo-controlled trial to evaluate the immunogenicity of a candidate vaccine against American tegumentary leishmaniasis. <i>Acta Trop</i> 80:251-260.	179
5.13. Estudo clínico com a vacina de Necator.....	181
5.13.1. Diemert DJ, Pinto AG, Freire J, Jariwala A, Santiago H, Hamilton RG, Periago MV, Loukas A, Tribolet L, Mulvenna J, Correa-Oliveira R, Hotez P, Bethony JM 2012. Generalized urticária induced by the <i>Na</i> -ASP-2 hookworm vaccine: Implications for the development of vaccines against helminths. <i>J Allergy Clin Immunol</i> 150:169-176.	181
5.14. Sinopse dos estudos analisados.....	185
5.15. Estudos clínicos ao longo do tempo.....	217
SEGUNDA PARTE - CONTRIBUIÇÕES DO AUTOR PARA O PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÕES	221
6. DO PRONTO-SOCORRO AO POSTO DE SAÚDE	223

6.1. Anexo. Íntegra de todos os trabalhos com vacinas em que o autor da tese participou como pesquisador principal e/ou primeiro autor.	233
7. DISCUSSÃO	235
8. PERSPECTIVAS	249
9. DIFICULDADES NA ELABORAÇÃO DESSA TESE	251
10. CONCLUSÕES.....	253
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	255
12. GALERIA DE FOTOS.....	275

Índice de Figuras

FIGURA 1. OSWALDO CRUZ	1
FIGURA 2. OSWALDO CRUZ OBSERVA UM MICROSCÓPIO AO LADO DE SEU FILHO	2
FIGURA 3. CARLOS CHAGAS.....	4
FIGURA 4. CARLOS CHAGAS, ADOLPHO LUTZ, E ALBERT EINSTEIN	5
FIGURA 5. ANTONIO CARDOSO FONTES E PAUL EHRLICH	5
FIGURA 6. INTRODUÇÃO GRADUAL DA VACINA CONTRA FEBRE AMARELA NO BRASIL.	35
FIGURA 7. HENRIQUE DE AZEVEDO PENNA.....	35
FIGURA 8. DR. H. H. SMITH VACINANDO UMA CRIANÇA	36
FIGURA 9. DR. FRED SOPER, VACINANDO EM BELÉM, BRASIL	36
FIGURA 10. O VIROLOGISTA HILARY KOPROWSKI E PENNA	37
FIGURA 11. FOTO DOS FUNCIONÁRIOS DO SERVIÇO DE FEBRE AMARELA E DA F. ROCKEFELLER.....	38
FIGURA 12. ABRINDO A CASCA DO OVO COM TOCHA DE ÓXI-ACETILENO.....	40
FIGURA 13. DR. JOSÉ FRANCISCO DE MADUREIRA PARÁ	40
FIGURA 14. DRS. CAIO DE SOUZA MANSO E NELSON CARYL DAVIS.....	41
FIGURA 15. JOSÉ FONSECA DA CUNHA, COLEGAS E AMIGOS	43
FIGURA 16. VACINAÇÃO EM ÁREA RURAL. FONTE	47
FIGURA 17. ATESTADO DE VACINAÇÃO CONTRA FEBRE AMARELA	47
FIGURA 18. OSCAR LOPES, SUELY GUIMARÃES E RICARDO DE CARVALHO	51
FIGURA 19. DR. ALBERTO ROMEU NICOLAU INOCULANDO UM MACACO	52
FIGURA 20. AKIRA HOMMA, DIRETOR DE BIO-MANGUINHOS.....	52
FIGURA 21. MARCOS DA SILVA FREIRE.....	55
FIGURA 22. DERIVAÇÃO DA VACINA DE FEBRE AMARELA, LINHAGENS 17D E 17DD.....	58
FIGURA 23. RICARDO GALLER.....	59
FIGURA 24. RENATO MARCHEVSKY.....	59
FIGURA 25. LUIZ ANTONIO BASTOS CAMACHO	61
FIGURA 26. GRUPO DE PESQUISADORES E CONSULTORES	70
FIGURA 27. VÍRUS CIRCULANTES, INTERFÉRON E ANTICORPOS INIBIDORES DA HEMAGLUTINAÇÃO.....	88
FIGURA 28. NÚMERO DE CASOS DE FEBRE AMARELA E DOSES DE VACINAS APLICADAS.....	102
FIGURA 29. GUILLARDO MARTINS ALVES E KONOSUKE FUKAI	107
FIGURA 30. COEFICIENTE DE INCIDÊNCIA E COBERTURA VACINAL DO SARAMPO	110
FIGURA 31. GRUPO DO LABORATÓRIO DE POLIOMIELITE	115
FIGURA 32. HERMANN G. SCHATZMAYR.....	117
FIGURA 33. COEFICIENTES DE INCIDÊNCIA DE POLIOMIELITE E COBERTURA VACINAL.....	123
FIGURA 34. COBERTURAS VACINAIS DA VACINA HIB E INCIDÊNCIA/100.000 HAB DE MEN POR HIB.....	146
FIGURA 35. FONTES DE FINANCIAMENTO DAS PESQUISAS EM QUE HOUVE A INFORMAÇÃO	216
FIGURA 36. NÚMERO DE ESTUDOS CLÍNICOS COM VACINAS POR DÉCADA	217
FIGURA 37. NÚMERO DE ESTUDOS CLÍNICOS COM VACINAS POR ANO E POR DÉCADA	218
FIGURA 38. NUMERO DE AUTORES POR ARTIGO E POR DÉCADA.....	219
FIGURA 39. NÚMERO DE INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS POR ARTIGO E POR DÉCADA	219

Índice de Tabelas

TABELA 1. SUMÁRIO DE ESTUDOS DE DURAÇÃO DA IMUNIDADE DA VFA REALIZADOS NO BRASIL.....	64
TABELA 2. SINOPSE DOS ESTUDOS ANALISADOS EM ORDEM SEQUENCIAL DE APRESENTAÇÃO	187
TABELA 3. NÚMERO DE ESTUDOS CLÍNICOS POR TIPO DE VACINA	207
TABELA 4. SINOPSE DOS ESTUDOS ANALISADOS EM ORDEM CRONOLÓGICA.	209
TABELA 5. FONTES DE FINANCIAMENTO DAS PESQUISAS ANALISADAS	215

Lista de Siglas e Abreviaturas

- Anti-HBs – Anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ASCLIN – Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos/Fiocruz
- BCG - Bacilo de Calmette e Guérin, vacina contra tuberculose
- BIREME – Biblioteca Regional de Medicina, da OPAS/OMS
- BM – Bio-Manguinhos
- BPF – Boas Práticas de Fabricação
- CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CCID₅₀ – *Cell culture Infectious Dose* 50%, uma medida de potência; é a dose capaz de infectar 50% das células de cultura
- CEP – Comissão de Ética em Pesquisa
- CIFAVI – Comitê Interinstitucional de Farmacovigilância de Vacinas e Outros Imunobiológicos
- CIOMS – *International Organizations of Medical Sciences*
- CNPq – Conselho Nacional de Pesquisas
- CNRE - Centro Nacional de Referência para Enterovírus
- CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
- CONSORT – *Consolidated Standards of Reporting Trials*
- CPqRR – Centro de Pesquisas René Rachou
- DTP – Vacina contra difteria, tétano e coqueluche (pertússis)
- DTP_w – Vacina DTP com componente pertússis de células inteiras
- DTP/Hib – Vacina contra difteria, tétano, coqueluche (pertússis) e *Haemophilus influenzae* tipo b
- E – Prefixo utilizado para identificar vacinas preparadas sem qualquer tipo de soro, nos primórdios da vacina de febre amarela.
- ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública
- EP – “*Egg passage*”
- FAEPA - Fundação de Apoio ao Ensino e à Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
- FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FAPERJ – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
FAPESB – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia
FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FESIMA – Fundo Especial de Saúde para Imunização em Massa e Controle de Doenças do Estado de São Paulo
FINEP – Financiadora de Estudos e Projetos, empresa pública vinculada ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA – Fundação Nacional de Saúde, do MS
GSK – GlaxoSmithKline
HB – Hepatite B
HBsAg – Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
Hib – *Haemophilus influenzae* tipo b
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
HPV – Papilomavírus
IAL – Instituto Adolpho Lutz
IC 95% – Intervalo de confiança de 95%
ICH – *International Conference on Harmonization*
ID – Intradérmico
IEC – Instituto Evandro Chagas
IgE – Imunoglobulina E
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IH – Anticorpos inibidores da hemaglutinação
IM – Intramuscular
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IOC – Instituto Oswaldo Cruz
ISRCTN – *International Standard Randomised Controlled Trial Number* – Instituição que permite o registro internacional *online* de ensaios clínicos controlados
LD₅₀ – Dose letal para 50% dos camundongos inoculados, unidade utilizada para determinar a potência da vacina de febre amarela

LILACS – Base de dados da literatura científica e técnica da América Latina e Caribe, da BIREME

LST – *Leishmanin skin test* (teste cutâneo para *leishmania*)

MMR – Vacina contra sarampo, caxumba e rubéola; em português, SCR

MS – Ministério da Saúde

MSD – Merck, Sharp & Dohme

mUI – mili unidades internacionais (em inglês, mIU)

NIAID – *National Institute of Allergy and Infectious Diseases, USA*

NIH – *National Institutes of Health, USA*

NT – *Neutralization titer*

OMS – Organização Mundial de Saúde, WHO em inglês

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

OR – *Odds ratio*, razão de chances

PCR – Reação em cadeia de polimerase

PDTIS – Programa de Desenvolvimento de Tecnologias e Insumos para a Saúde da Fiocruz

PFU – *Plaque forming units*, unidades formadoras de placas, unidade também utilizada para determinar a potência da vacina de febre amarela

PNI – Programa Nacional de Imunizações

PRNT – *Plaque reduction neutralization titer*, título de neutralização por redução de placas.

PRNT₅₀ – Maior diluição em que há redução de 50% nas placas de células infectadas

PRNT₉₀ – Maior diluição em que há redução de 90% nas placas de células infectadas

PRP – Poli-ribosil-ribitol fosfato, polissacarídeo da cápsula do *Haemophilus influenzae* tipo b

PRP-T – Poli-ribosil-ribitol fosfato conjugado ao toxóide tetânico

PubMed – Portal de busca bibliográfica do *National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health*, dos Estados Unidos

qPCR – Reação em cadeia de polimerase quantitativa

RNA – *Ribonucleic acid*, ácido ribonucléico

RT-PCR – Reação de transcrição reversa em tempo real

SC – Soroconversão, subcultura ou subcutâneo, dependendo do contexto

SCR – Vacina contra sarampo, caxumba e rubéola; em inglês, MMR

SES – Secretaria de Estado de Saúde

SF – O prefixo SF era utilizado para identificar vacinas de febre amarela preparadas com soro humano, nos primórdios da vacina de febre amarela.

SP – Soropositividade

SPF – Ovos de galinha *specific pathogenic free*, isto é, livres de contaminação por patógenos específicos

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde

TMG – Título médio geométrico

U – Unidades

UI – Unidades internacionais (em inglês, IU)

VOP – Vacina oral de poliomielite.

Um pequeno glossário de termos imunológicos pode ser consultado na página

71.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O que são o Instituto Oswaldo Cruz, a Fiocruz e Bio-Manguinhos.

As histórias do Instituto Oswaldo Cruz, da Fiocruz e de Bio-Manguinhos se confundem e não podem ser separadas. A criação do Instituto Soroterápico Municipal e depois Federal, em 25 de maio de 1900, marca o início da participação efetiva de Oswaldo Cruz na saúde pública brasileira, como diretor técnico do novo instituto, logo depois chamado de Instituto de Patologia Experimental de Manguinhos. A nomeação de Oswaldo Cruz foi por indicação de Émile Roux, do Instituto Pasteur, ao Barão de Pedro Afonso, que por sua vez indicou o seu nome ao prefeito Cesário Alvim. Em 1902, Oswaldo Cruz foi nomeado Diretor do Instituto, e em 1903, Diretor Geral de Saúde Pública. Era muito jovem, apenas 30 anos (Figura 1).

Figura 1. Oswaldo Cruz



Fonte: Acervo da Casa de Oswaldo Cruz

Sua atuação e liderança forte para o combate à febre amarela, peste bubônica e varíola foram excepcionais e marcaram época, mas a construção e instalação do

castelo mourisco, sede do Instituto, posteriormente denominado Instituto Oswaldo Cruz, e a implementação a partir dessa base de atividades pioneiras em nosso meio foi sua obra mais perene.

Figura 2. Oswaldo Cruz observa um microscópio ao lado de seu filho Bento e de Burle de Figueiredo



Fonte: Acervo da Casa de Oswaldo Cruz

Oswaldo Cruz seguiu a orientação do Instituto Pasteur, integrando produção, pesquisa, formação e ensino. Essas vertentes estão hoje distribuídas pelas diversas unidades da Fiocruz, como o Instituto Oswaldo Cruz (pesquisa), Bio-Manguinhos (produção), a Escola Nacional de Saúde Pública, e a Escola Politécnica Joaquim Venâncio (formação).

É altamente desejável a integração dessas diversas áreas de atuação, pois todas têm pontos de confluência e o processo de inovação resulta da interação de diversos saberes e experiências.

O Instituto Soroterápico passou a denominar-se Instituto Oswaldo Cruz (IOC).

Passaram pelo Instituto Oswaldo Cruz, sob a influência direta de Oswaldo Cruz, um grupo altamente motivado e brilhante, entre outros: Carlos Chagas, Ezequiel Dias, Antonio Cardoso Fontes, Eduardo Rabello, Paulo Parreiras Horta, Henrique de Beaurepaire Aragão, Affonso MacDowell, Henrique da Rocha Lima, Raul de Almeida Magalhães, Arthur Neiva, Antônio Gonçalves Peryassú, José Gomes Faria, Alcides Godoy, Arthur Moses. Rapidamente esse grupo passou a publicar nas melhores revistas científicas da época.

A vacina da manqueira (vacina veterinária, contra o carbúnculo sintomático, causado pelo *Clostridium chauvoei*), descoberta em 1906 por Alcides Godoy e Astrogildo Machado, foi o primeiro produto patenteado e comercializado pelo Instituto Oswaldo Cruz, e durante muito tempo foi a base de sua sustentação financeira.

Em 1907, o Instituto foi premiado com a medalha de ouro do Congresso Internacional de Higiene e Demografia, em Berlim, o que firmou seu prestígio internacional.

O Curso de Aplicação, inaugurado em 1908, foi a primeira escola brasileira de pós-graduação.

Carlos Chagas foi um pesquisador brilhante, descobridor da etiologia e patogenia da tripanossomíase americana (doença de Chagas). Como Oswaldo Cruz, Carlos Chagas teve atuação administrativa relevante, como diretor do Instituto Oswaldo Cruz, de 1917 a 1934, e do Departamento Geral de Saúde Pública, entre muitas outras atividades públicas. Criou a cadeira de doenças tropicais na Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro (Figura 3).

Figura 3. Carlos Chagas



Fonte: Acervo da Casa de Oswaldo Cruz

Adolpho Lutz, de ascendência alemã, ingressou no Instituto em 1908, com mais de cinquenta anos, e já famoso por suas pesquisas em que o rigor científico era extraordinário. Ele foi o mentor de um grupo de médicos muito jovens, que haviam sido contratados por Oswaldo Cruz. O Instituto, nessa época, acolheu vários pesquisadores alemães: Max Hartmann, do Instituto de Moléstias Infecciosas de Berlim, dois professores da Escola de Medicina Tropical de Hamburgo, Stanislas Von Prowazek, autor de trabalhos importantes sobre clamidozoários, G. Giemsa, inventor de método de coloração para observação de hematozoários, e Hermann Duerck, docente de anatomia patológica de Iena (Benchimol 2003). (Figuras 4 e 5).

Figura 4. Carlos Chagas, Adolpho Lutz, e grupo de cientistas do Instituto recebendo Albert Einstein, em 1925



Fonte: Acervo da Casa de Oswaldo Cruz

Figura 5. Antonio Cardoso Fontes e Paul Ehrlich



Fonte: Acervo da Casa de Oswaldo Cruz

Essa etapa brilhante do Instituto Oswaldo Cruz dá uma idéia do ambiente intelectual e humano favorável, altamente estimulante, que permitiram tantas descobertas inovadoras em período tão curto.

As “Memórias do Instituto Oswaldo Cruz” são um patrimônio científico e cultural, sendo o mais antigo e renomado periódico biomédico da América latina.

A Fundação Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz – foi fundada em maio de 1970, passando a ser designada Fundação Oswaldo Cruz, com a mesma sigla, em maio de 1974.

Bio-Manguinhos foi criado em 1976, para dar sustentação ao Programa Nacional de Imunizações (PNI), estabelecendo rapidamente acordo de transferência de tecnologia com o Instituto Mérieux, para obtenção de vacinas contra meningococos A e C, que nesta época causavam dramática epidemia, com instituições japonesas, para obtenção das vacinas contra o sarampo e a poliomielite, e depois várias outras empresas, com destaque para GlaxoSmithKline (GSK).

Em 1983, a criação do Programa de Autossuficiência Nacional em Imunobiológicos contribuiu para o desenvolvimento dos produtores nacionais e permitiu disponibilizar vacinas de boa qualidade de maneira contínua.

No que se refere à qualidade das vacinas, deve-se destacar a importância da criação do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, o INCQS, em 1981, e o fortalecimento da agência reguladora, a Anvisa.

A história do IOC e da Fiocruz se estende por 113 anos, ao longo dos quais passou por períodos de esplendor e crises. No conjunto, uma história que orgulha o Brasil e sua comunidade científica.

A Fiocruz atualmente tem 17 Unidades Técnico-Científicas, sendo 11 localizadas no Rio de Janeiro, cinco localizadas em outros Estados, uma em Maputo, capital do Moçambique, uma Fundação de Apoio, quatro Unidades Administrativas e cinco Escritórios, a saber:

No Rio de Janeiro

As unidades técnico-científicas localizadas no Rio de Janeiro são as seguintes:

- Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos);
- Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL);
- Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde (ICICT);
- Casa de Oswaldo Cruz (COC);
- Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP);
- Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio (EPSJV);
- Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos);
- Instituto Fernandes Figueira (IFF);
- Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC);
- Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde (INCQS);
- Instituto Oswaldo Cruz (IOC).

Fora do Rio de Janeiro

As unidades técnico-científicas localizadas fora do Rio de Janeiro são as seguintes:

- Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM) - Fiocruz Pernambuco;
- Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) - Fiocruz Bahia;
- Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane (CPqLMD) - Fiocruz Amazônia;
- Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR) - Fiocruz Minas Gerais;
- Instituto Carlos Chagas (ICC) - Fiocruz Paraná;
- Escritório Internacional em Maputo - Fiocruz África

Fundação de apoio

- Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Saúde (Fiotec)

Unidades Administrativas

- Diretoria de Administração do Campus (DIRAC);
- Diretoria de Administração (DIRAD);
- Diretoria de Recursos Humanos (DIREH);
- Diretoria de Planejamento (DIPLAN).

Escritórios

- Fiocruz Ceará
- Fiocruz Mato Grosso do Sul
- Fiocruz Piauí
- Fiocruz Rondônia
- Diretoria Regional de Brasília (Fiocruz Brasília)

1.2. O que é o Programa Nacional de Imunizações

O Programa Nacional de Imunizações foi criado em 1973, impulsionado pelo êxito da eliminação da varíola no Brasil e nas Américas. Apesar desse êxito, na década de 70 do século passado as vacinações e a vigilância epidemiológica estavam engatinhando. As coberturas vacinais na rotina dos centros de saúde eram baixíssimas, o sistema de informações era precário, e as vacinas eram em geral de má qualidade. O sucesso frente à varíola deveu-se à estratégia utilizada, sob a forma de campanha, e às características da doença, facilmente diagnosticável e com período de incubação suficientemente longo para permitir bloqueios.

Foi muito importante e uma decisão acertada introduzir os Dias Nacionais de Vacinação, para eliminar a poliomielite do Brasil. O sucesso dessa estratégia deu prestígio e fortaleceu o sistema de imunizações, inclusive nas rotinas.

Em 1989 ocorreu o último caso de poliomielite no Brasil, e atualmente deixaram de circular os vírus do sarampo e da rubéola, fruto de uma combinação de melhores rotinas e campanhas periódicas.

Expandiram-se as vacinas do calendário básico e as coberturas são altas, e com isso as doenças evitáveis por vacina estão todas sob controle, com exceção da tuberculose, pois o BCG confere proteção limitada.

Além disso, as vacinações se expandiram para todas as faixas etárias, com a vacinação contra rubéola em adolescentes e adultos jovens, contra gripe (influenza) em idosos e em grupos especiais de risco de todas as idades.

Foram introduzidas recentemente vacinas contra o meningococo C, contra 10 sorotipos de pneumococos, contra rotavírus, em breve vacinas contra varicela, contra

o vírus papiloma (contra câncer do colo do útero e verrugas genitais), contra hepatite A, e pertússis acelular para gestantes. Essas vacinas estão sendo introduzidas mediante acordos de transferência de tecnologia, o que permite a incorporação acelerada da tecnologia de produção e garante ao Programa Nacional de Imunizações – o PNI - o abastecimento contínuo de vacinas de ótima qualidade e preço acessível.

O calendário vacinal se expandiu e é atualizado periodicamente (Martins et al. 2013a).

Aos 40 anos de sua criação, o PNI é, reconhecidamente, o melhor programa de saúde pública do Brasil, e um dos melhores do mundo. É justo motivo de orgulho (Ministério da Saúde 2013).

Entretanto, muito há ainda por fazer, pois as elevadas coberturas vacinais não são homogêneas e escondem bolsões de coberturas baixas, geralmente coincidindo com bolsões de pobreza.

A próxima etapa será um grande desafio, e consiste em levar as imunizações a essas regiões e locais de difícil acesso, especialmente em localidades remotas no interior do Brasil e em algumas periferias de grandes cidades.

Isso vai implicar em um programa mais seletivo em suas ações, com busca ativa dos faltosos às imunizações, e adaptação dos serviços às condições de vida das mães.

Espera-se ainda que se consigam novas vacinas, por exemplo, contra dengue, o vírus HIV, a hepatite C, a tuberculose (uma vacina mais eficaz) e a coqueluche (uma vacina menos reatogênica e ainda mais eficaz).

Vacinas contra doenças parasitárias estão por enquanto num horizonte mais distante.

É bem provável, além disso, que as imunizações se estendam às doenças não-infecciosas, e quando isso acontecer será atingido um novo patamar.

O PNI conquistou a confiança da população, graças à sua atuação firme e comprometida, à qualidade de suas vacinas, às suas conquistas no controle ou eliminação de doenças.

É preciso preservar essa confiança, como o seu bem mais precioso. Nesse sentido, com a queda da incidência das doenças, a segurança das vacinas tornou-se uma questão cada vez mais discutida e controlada.

Criou-se um Manual de Vigilância de Eventos Adversos Pós-Vacinais, desde 1998, agora em 3ª edição, e um sistema informatizado de notificação.

Ainda no âmbito do Ministério da Saúde, criou-se o CIFA VI – Comitê Interinstitucional de Farmacovigilância de Vacinas e outros Imunobiológicos – com a participação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), em parceria com o PNI e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS.

Internacionalmente, a Brighton Collaboration – um grupo de especialistas em farmacovigilância em vacinas, fundado na cidade de Brighton, na Inglaterra, vem criando uma série de definições de eventos adversos a vacinas e estabelecendo normas para sua notificação. O CIOMS – *Council for International Organizations of Medical Sciences* - é uma instituição altamente respeitada, que trabalha em conexão com a Organização Mundial de Saúde, e que também tem atuação relevante na farmacovigilância de vacinas e nos aspectos éticos dos estudos clínicos com vacinas.

Mais recentemente, a Organização Mundial de Saúde está implantando um sistema internacional de farmacovigilância de vacinas.

O Ministério da Saúde, a Anvisa e Bio-Manguinhos/Fiocruz têm participado ativamente de todas essas iniciativas.

Deve-se ressaltar que o PNI tem contribuído para o desenvolvimento tecnológico em vacinas, através de suas demandas aos produtores nacionais e pelo apoio que tem dado às pesquisas com vacinas.

1.3. Etapas do desenvolvimento tecnológico em vacinas: da bancada ao Centro de Saúde.

O desenvolvimento de uma vacina é um procedimento complexo, que envolve muitas etapas, que se desenrolam de maneira progressiva.

Inicialmente, são os estudos pré-clínicos, que são estudos *in vitro* e em animais de laboratório, com o objetivo de exploração inicial da imunogenicidade e segurança do produto experimental. Incluem a exploração de uma idéia, muitas vezes por meio da integração de diversas tecnologias, visando chegar a um produto. A regra geral para o desenvolvimento do produto ao longo das diversas etapas é o estabelecimento de

parcerias, pois é praticamente impossível que um só grupo tenha todos os insumos, domine todos os processos, e seja capaz de realizar todos os estudos.

Dois exemplos históricos podem ilustrar a seqüência de etapas do processo de inovação e a necessidade de integração de conhecimentos e experiências. No desenvolvimento da vacina de febre amarela, Theiler aproveitou o caminho aberto por Pasteur de isolamento do agente infeccioso e passagens em animais para modificação das suas características biológicas e adaptá-lo à produção de vacinas. No Instituto Rockefeller, utilizou os frascos de culturas de tecidos de Carrel (1923), que ali tinha trabalhado e estava interessado em transplantes de órgãos, para culturas do vírus da febre amarela *in vitro*; e utilizou a técnica desenvolvida por Woodruff e Goodpasture (1931), para inoculação de vírus da febre amarela em ovos embrionados de galinha, visando sua atenuação.

Theiler introduziu uma nova técnica: retirou o tecido nervoso dos embriões de galinha, para diminuir o neurotropismo da vacina. Henrique de Azevedo Penna, no Instituto Oswaldo Cruz, aperfeiçoou a técnica de retirada dos embriões do ovo, e com isso não houve mais necessidade de adicionar soro humano na produção da vacina de febre amarela, evitando a hepatite de longo período de incubação (hepatite B). Finalmente, Alberto Romeu Nicolau introduziu a técnica de inoculação na cavidade vitelina, em vez da cavidade amniótica do embrião de galinha, aumentando o rendimento da produção (Nicolau 1988).

O segundo exemplo: em 1923, Oswald Avery, em parceria com Michael Heidelberger, um químico, descobriram no Instituto Rockefeller que os polissacarídeos capsulares são responsáveis pelos sorotipos pneumocócicos (Heidelberger & Avery 1923; Heidelberger & Avery 1924). Karl Landsteiner, que também fora trabalhar no Instituto Rockefeller, havia estabelecido o conceito de hapteno, no início dos anos 20 (Landsteiner 1990). Avery e Walther Goebel descobriram que os polissacarídeos pneumocócicos (haptenos) conjugados a proteínas tornam-se mais imunogênicos. Esses estudos foram retomados muitos anos depois, e finalmente Porter Anderson e David Smith, Rachel Schneerson e John Robbins (dois grupos independentes), desenvolveram as vacinas conjugadas a proteínas de *H. influenzae* tipo b (Artenstein 2010), que abriram o caminho para as outras vacinas conjugadas, contra meningococos e pneumococos.

Esse dois exemplos, que poderiam ser multiplicados, mostram claramente que a inovação faz parte de um processo histórico, começa muito tempo antes, e não se deve a um só indivíduo.

Seria mais certo falar-se em desenvolvimento de processos e produtos, em vez de descobertas.

Também é interessante observar a proximidade na mesma instituição, o Instituto Rockefeller, de tantos pesquisadores de talento. Mas não é suficiente o talento: é preciso tenacidade e dispor de um ambiente estimulante e produtivo, com a compreensão de que todo progresso é feito por meio de experimentos com fracassos, erros e acertos, e que o sucesso pode demorar a chegar ou até não acontecer.

Hoje temos ainda outro problema: muitos dos processos e insumos utilizados nas pesquisas são protegidos por patentes.

Após o estabelecimento de prova de conceito, de uma avaliação positiva das possibilidades de se chegar a um produto, seguem os estudos de fase I, em pequeno número de participantes, basicamente para saber se o produto é seguro. Se o estudo é aprovado, passam-se aos estudos de fase II, que continuam investigando a segurança, mas que agora privilegiam a eficácia. Muitas vezes são vários estudos de fase II, por exemplo, 2a, 2b, 2c, explorando aspectos ainda não devidamente resolvidos nos estudos anteriores. Se aprovado, passa-se então para a fase III, com número ainda maior de participantes, que em alguns casos chega a muitos milhares, com acompanhamento durante muitos anos, como as vacinas de papiloma. Se o estudo de fase III é aprovado, habilita-se a registro na agência reguladora nacional (no Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Anvisa) para comercialização.

Mesmo após o registro, continuam os estudos, chamados de fase IV, que investigam o impacto da vacina na incidência da doença e a possibilidade de eventos adversos raros não percebidos nas etapas anteriores. A importância desses estudos pode ser exemplificada pela primeira vacina de rotavírus, que foi suspensa devido a um aumento de risco de invaginação intestinal, somente identificado claramente após o seu uso em larga escala (Clark et al. 2013).

Em todas essas etapas há um acompanhamento das Comissões de ética e da Anvisa, e os produtos têm que ser produzidos de acordo com as boas práticas de

fabricação e os estudos clínicos têm que ser realizados em condições de boas práticas clínicas.

A grande maioria dos produtos propostos pelos estudos de bancada não passa pelos crivos dos testes clínicos. O comportamento da vacina no ser humano é frequentemente muito diferente do que se observa em estudos em animais de laboratório.

Com tudo isso, o desenvolvimento de vacinas é um processo incerto, lento e dispendioso. Em geral, são necessários pelo menos 10 anos, e frequentemente muito mais, para se chegar a uma vacina aceitável para uso humano.

1.4. A legislação internacional sobre pesquisa clínica

A ética da pesquisa clínica é um processo em evolução, e reflete um progresso ético da sociedade como um todo.

O ponto comum em todas as infrações de ética é a suposição de que há seres inferiores e que para estes as regras éticas básicas não se aplicam.

Durante muito tempo admitiu-se que escravos, negros, indígenas, prisioneiros, deficientes mentais, ou mesmo crianças não são verdadeiramente cidadãos.

Os fascistas germânicos foram mais longe e consideraram os judeus uma raça indigna, e que todas as raças, exceto a ariana, eram inferiores.

Essas categorias de “sub-homens” foram objeto de experimentos e pesquisas clínicas em condições que provocam repulsa.

A base da ética é o reconhecimento de que todas as pessoas são diferentes em suas particularidades, mas essencialmente iguais.

Essa base ética de fraternidade universal tem inspiração cristã, foi reiterada no movimento iluminista francês que levou à revolução francesa, no Documento da Independência americana, na Declaração Universal dos Direitos do Homem, e na luta pelos direitos civis liderada por Martin Luther King, nos Estados Unidos, Gandhi na Índia, e Nelson Mandela na África do Sul.

O marco inicial da legislação internacional sobre pesquisa clínica é o Código de Nuremberg, elaborado como reação aos experimentos abusivos cometidos pelos

alemães aos prisioneiros durante a segunda guerra mundial. Surgiu posteriormente a “Declaração de Helsinki”, revisada periodicamente, e que hoje constitui a referência ética internacional.

Ao mesmo tempo, a regulação das práticas da pesquisa clínica, por meio das Boas Práticas Clínicas, foi consubstanciada na ICH – *International Conference of Harmonization* – cujos signatários são os países desenvolvidos da América do Norte, Europa e Japão, de 1996. Na América Latina, o documento correspondente é o “Documento das Américas” (Organização Pan-Americana da Saúde 2005).

O CIOMS, em colaboração com a OMS, estabeleceu e divulgou normas éticas internacionais para pesquisas biomédicas envolvendo seres humanos, na publicação “*International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects*”, que pode ser obtida na internet no seguinte endereço (URL): http://www.cioms.ch/publications/guidelines/guidelines_nov_2002_blurb.htm.

Uma iniciativa importante é um “*check list*” que se deve aplicar a relatos de estudos clínicos randomizados, que permite entender claramente os seus resultados. A lista contém 22 itens que foram escolhidos por serem considerados essenciais para a adequada avaliação da relevância ou a confiabilidade dos resultados. A declaração CONSORT (“*Consolidated Standards of Reporting Trials*”) foi criada por investigadores e editores e tem o apoio de diversos grupos, como: *International Committee of Medical Journal Editors, Council of Science Editors, e World Association of Medical Editors*. Alguns artigos científicos mais recentes apresentam acesso ao “*check list*”. Esse documento foi primeiro publicado em 2001 e a versão mais recente é de 2010 (<http://www.consort-statement.org/about-consort/history/>).

Outra exigência recente é o registro internacional, recomendado pela OMS desde 2006 (WHO 2012). Uma das finalidades do registro internacional, prévio ao início do estudo, é a garantia de que os estudos cujos resultados não foram favoráveis também sejam divulgados.

1.5. A legislação brasileira sobre pesquisa clínica

No Brasil, a legislação sobre pesquisa clínica emanou do Conselho Nacional de Saúde, em uma série de Resoluções. A primeira foi a Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996, seguindo-se várias outras, que criaram um arcabouço legal para a realização de pesquisa clínica no Brasil. Foi criado o Sistema CEP/CONEP, integrado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP – do Conselho Nacional de Saúde, e pelos Comitês de Ética em Pesquisa – CEPs, que avaliam os protocolos, autorizam e acompanham a realização das pesquisas, e aprovam os resultados. A Resolução mais recente é a de nº 466, de 12 de dezembro de 2012, que prevê a regulamentação da acreditação de Comitês de Ética em Pesquisa, passo importante para que o sistema possa atuar de maneira mais descentralizada.

A CONEP é uma instância colegiada, de natureza consultiva, educativa e formuladora de diretrizes e estratégias no âmbito do Conselho Nacional de Saúde. Sua principal atribuição é o exame dos aspectos éticos das pesquisas que envolvem seres humanos. Como missão, elabora e atualiza as diretrizes e normas para a proteção dos participantes de pesquisa e coordena a rede de Comitês de Ética em Pesquisa das instituições. Cabe à CONEP avaliar e acompanhar os protocolos de pesquisa em áreas temáticas especiais como: genética e reprodução humana; novos equipamentos; dispositivos para a saúde; novos procedimentos; população indígena; projetos ligados à biossegurança e com participação estrangeira. A CONEP também se constitui em instância de recursos para qualquer das áreas envolvidas.

Multiplicaram-se cursos e reuniões sobre boas práticas clínicas, que envolvem fundamentalmente aspectos éticos da pesquisa clínica.

Excelentes livros de Bioética têm sido publicados, inclusive no âmbito da Fiocruz, e que ajudam a refletir sobre o tema (Schramm et al. 2005; Rego et al. 2009; Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo 2008). Quatro princípios são fundamentais: respeito à autonomia do sujeito de pesquisa (participantes de pesquisa, v. abaixo), beneficência, não maleficência, e justiça.

Paralelamente, fortaleceu-se a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a Anvisa, que nas RDCs – Resoluções da Diretoria Colegiada, estabeleceu as normas de Boas Práticas Clínicas.

As Boas Práticas de Fabricação e as Boas Práticas de Laboratório também fazem parte das normas de pesquisa clínica.

A Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (Conselho Nacional de Saúde 2012) passa a chamar os voluntários dos estudos clínicos de “participantes de pesquisa”. Para simplificação do texto, e melhor leitura, adotei a palavra “participantes”, como regra geral, pois o contexto se refere claramente à pesquisa clínica.

1.6. As Organizações Representativas de Pesquisa Clínica

Para a realização de pesquisas clínicas constituíram-se as Organizações Representativas de Pesquisa Clínica, que são responsáveis, perante o patrocinador, pela boa condução do estudo clínico, de acordo com as normas pertinentes.

Os estudos clínicos – ou pesquisas clínicas – são, portanto, realizadas em ambiente fortemente regulamentado, e são ainda monitoradas por Comitês, interno e externo, de monitoramento de dados, este último independente, e constituído por pessoas de reconhecida integridade, bem como conhecimento e experiência no objeto da pesquisa.

1.7. A Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos/Fiocruz

Bio-Manguinhos/Fiocruz, criou uma Assessoria Clínica (Asclin), que se estruturou como Organização Representativa de Pesquisa Clínica, e vem realizando várias pesquisas importantes para a Fiocruz e o Ministério da Saúde. Todo o seu grupo foi treinado em Boas Práticas Clínicas e todas as suas pesquisas são realizadas mediante autorização e acompanhamento pelo sistema CEP/CONEP, monitoria interna, Comitê Independente de Monitoramento de Dados e Anvisa. Além de desenvolver pesquisas com sua participação direta, várias parcerias foram estabelecidas pela Asclin com instituições universitárias ou centros de pesquisa, para complementar suas atividades. Assim, tem realizado pesquisas clínicas em todas as fases, com vacinas, biofármacos, e reagentes diagnósticos.

1.8. As Redes de Pesquisa Clínica

Vêm se multiplicando as iniciativas para fortalecer a pesquisa clínica no Brasil. A Rede Nacional de Pesquisa Clínica em Hospitais de Ensino é uma iniciativa do Ministério da Saúde e da Ciência e Tecnologia. A rede prioriza o desenvolvimento de ensaios clínicos de medicamentos, procedimentos, equipamentos e dispositivos diagnósticos, de interesse para o Sistema Único de Saúde, com a participação de hospitais universitários.

Constituiu-se, no âmbito da Fiocruz, a Rede Fiocruz de Pesquisa Clínica, cujo objetivo estratégico é: “Fortalecer o papel estratégico da pesquisa clínica na Fiocruz para a superação da vulnerabilidade tecnológica nacional, contribuindo para o alcance de autonomia, suficiência e racionalidade dos processos e produtos acessíveis ao cuidado da saúde da população brasileira”. A Fiocruz passou a integrar a Rede Nacional de Pesquisa Clínica (RNPC) em dezembro de 2009. A Rede Fiocruz de Pesquisa Clínica é uma estrutura horizontal, composta pelos Grupos de Pesquisa Clínica das Unidades da Fiocruz.

A Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos/Fiocruz faz parte da Rede Fiocruz de Pesquisa Clínica.

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Por que decidi elaborar essa tese, a história dos estudos clínicos na Fundação Oswaldo Cruz?

A primeira resposta é que eu sabia que essa seria uma tarefa difícil, mas prazerosa. Gosto de saber a história das coisas que existem, de onde vieram, como vieram. Entendo que saber a história permite ter uma compreensão mais profunda dos acontecimentos e pode ajudar a resolver novos problemas de forma criativa ou a fazer melhor o que já está estabelecido. Procurar entender o processo mental dos cientistas geniais que nos precederam pode contribuir para o nosso próprio desenvolvimento intelectual. Entrar em contato com a integridade moral dessas pessoas pode contribuir para a nossa elevação espiritual. Por outro lado, erros foram cometidos, que nos servem de alerta para que evitemos sua repetição, mas sabendo que é impossível avançar sem errar. Erro e acerto fazem parte do mesmo processo.

Segundo, pensei em dar uma retribuição a Bio-Manguinhos/Fiocruz, que me recebeu de braços abertos há mais de uma década. Penso que essa tese pode contribuir para o fortalecimento institucional de Bio-Manguinhos e da Fiocruz.

Bem sei que já foram elaborados trabalhos primorosos sobre história das vacinas na Fiocruz, mas o seu enfoque foi predominantemente o do historiador. O meu foco será predominantemente o do pesquisador clínico, procurando extrair ensinamentos e compreensão dos estudos clínicos nos respectivos contextos históricos.

Procurei também tornar a leitura agradável, evitando, por exemplo, um excesso de detalhamento.

O Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz tem um longo e relevante histórico de pesquisas clínicas, ligadas vitalmente à sua existência, desde os seus primórdios, com o desenvolvimento da vacina de febre amarela. É relevante resgatar de maneira sistematizada as pesquisas clínicas com vacinas, realizadas com a participação de qualquer das unidades da Fiocruz, procurando o seu resgate histórico e os ensinamentos deles advindos.

A análise de cada um dos estudos em seus contextos permite uma melhor compreensão de sua motivação e alcance. Além disso, a análise seqüencial do

conjunto dos estudos, quanto à sua metodologia, é uma fonte valiosa de informações e permite compreender de maneira clara a evolução histórica dos conceitos e práticas dos estudos clínicos.

Mais especificamente, em cada uma das atividades em que a Fiocruz está envolvida, o conhecimento das etapas percorridas até aqui pode dar uma melhor compreensão dos processos envolvidos e ajudar a conceber novas possibilidades criativas.

Esperamos ainda que esse estudo sirva de fonte de inspiração e estímulo para as novas gerações de pesquisadores, e que as pesquisas clínicas com vacinas tenham um impulso ainda maior nos anos vindouros.

Os trabalhos originais, objeto dessa tese, estão disponibilizados na íntegra, como anexos.

Dividimos a tese em duas partes. A primeira é uma revisão sistemática dos estudos clínicos, de acordo com a metodologia descrita em Material e Métodos (item 3). A segunda parte é uma descrição sumária de minha contribuição para o Programa Nacional de Imunizações, incluindo a realização de alguns estudos clínicos e de farmacovigilância com vacinas, em que fui investigador principal, e publicados em revistas indexadas nacionais e internacionais, ou em congressos internacionais.

**PRIMEIRA PARTE - REVISÃO SISTEMÁTICA DOS ESTUDOS
CLÍNICOS**

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Ter um entendimento do desenvolvimento dos estudos clínicos no âmbito da Fiocruz e derivar ensinamentos, conclusões e perspectivas.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Recuperar e ordenar os estudos clínicos já realizados no âmbito da Fiocruz.

3.2.2. Contextualizar cada um dos estudos clínicos, apresentar um resumo dos principais achados de cada estudo clínico e comentá-los.

3.2.3. Analisar todos os estudos clínicos em seu conjunto.

3.2.4. Extrair ensinamentos e conclusões.

3.2.5. Propor medidas que incrementem o aproveitamento de oportunidades para a realização de estudos clínicos inovadores.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A primeira questão a ser decidida no presente estudo é a seguinte: o que é um estudo clínico? O Manual para Boa Prática Clínica da ICH – Conferência Internacional de Harmonização – considera que os termos ensaio clínico e estudo clínico são sinônimos, e são assim definidos: “Qualquer investigação em sujeitos de pesquisa, objetivando descobrir ou verificar os efeitos farmacológicos, clínicos e/ou outros efeitos farmacológicos, clínicos e/ou outros efeitos farmacodinâmicos de produtos sob investigação, e/ou identificar reações adversas ao produto investigado, e/ou estudar a absorção, distribuição, metabolismo e excreção do produto investigado, com o objetivo de averiguar sua segurança e/ou eficácia.”

O Documento das Américas define ensaio clínico do mesmo modo.

No presente documento, usaremos os termos “ensaio clínico”, “estudo clínico” ou “pesquisa clínica” como sinônimos.

A Bill & Melinda Gates Foundation assim define ensaio clínico: “É um estudo prospectivo de pesquisa biomédica ou comportamental em sujeitos humanos, que é planejado para responder a questões específicas sobre intervenções biomédicas ou comportamentais (vacinas, medicamentos, tratamentos, dispositivos, ou novos modos de utilização de drogas conhecidas, tratamentos ou dispositivos)”. Essa definição é mais clara e abrangente que as anteriores, que têm o viés de estudo clínico com medicamentos (docs.gatesfoundation.org/grantseeker/documents/clinical_trials.pdf). Um estudo com vacinas não inclui habitualmente, por não ser aplicável, investigações de farmacocinética ou farmacodinâmica.

A Organização Mundial de Saúde assim define ensaio clínico: “Qualquer projeto de pesquisa que prospectivamente atribui participantes humanos ou grupos a uma ou mais intervenções relacionadas à saúde para avaliar os efeitos em desfechos de saúde” (www.who.int/ictrp/em/). Ensaio clínico também podem ser referidos como ensaios intervencionais. Intervenções incluem mas não estão restritas a medicamentos, células e outros produtos biológicos, procedimentos cirúrgicos, dispositivos, tratamentos comportamentais, alterações de procedimentos de cuidados, cuidados preventivos, etc. Esta definição inclui estudos de fases I a IV”.

Estudo observacional é aquele em que o investigador observa, em vez de influenciar na exposição e doenças entre os participantes. Não os incluímos nessa revisão, a não ser como informação adicional para esclarecer certos contextos.

Portanto, pelas últimas definições, ficam estabelecidas as seguintes características de um estudo clínico:

- É feito em seres humanos.
- É prospectivo.
- Resulta de um planejamento.
- Prevê uma intervenção (vacinação).
- Prevê uma resposta sobre questões que investiga, isto é, um efeito da vacinação no ser humano.

Outra característica dos estudos clínicos é a necessidade de que sejam realizados de acordo com preceitos éticos, em que os participantes da pesquisa são completamente informados sobre os riscos e benefícios do estudo e o seu direito de aceitar ou não participar, e até mesmo de abandoná-lo se assim o desejarem. Também é necessário que obedeçam à legislação de Boas Práticas Clínicas.

Além disso, todo estudo clínico prevê a elaboração de um protocolo com objetivos claros, bem fundamentado cientificamente, e que detalhe os procedimentos, o qual precisa ser aprovado por uma Comissão de Ética em Pesquisa reconhecida e pela agência reguladora, no caso do Brasil, a Anvisa.

Em relação aos requisitos do último parágrafo, não é possível adotá-los para os estudos clínicos mais antigos, em que ainda não havia esse tipo de regulamentação.

Para a seleção dos estudos clínicos objeto dessa revisão adotamos os seguintes critérios para inclusão dos estudos:

- Realizados em seres humanos.
- Prospectivos.
- A intervenção básica é a vacinação
- Acompanhamento longitudinal e individual dos participantes
- Publicados em periódicos médicos de caráter científico.

- Concebidos e realizados de acordo com os critérios éticos e legais para pesquisa clínica em seres humanos, com tolerância para os estudos mais antigos.
- Realizados com a participação de pelo menos uma unidade ou de um profissional da Fundação Oswaldo Cruz.

Esta definição restritiva, além de defensável conceitualmente, atendeu à necessidade de limitar o escopo da presente tese. Excluí assim estudos de casos sem os pré-requisitos acima, isto é, estudos retrospectivos, estudos clínico-epidemiológicos, soro-epidemiológicos, de farmacovigilância, estudos observacionais, etc, que não configuram o modelo clássico de um estudo clínico, embora alguns deles pudessem ser classificados como estudos clínicos, em definições mais abrangentes.

Para os estudos feitos nos primórdios do Instituto Oswaldo Cruz, que foram notáveis e fazem parte de sua história, tive que ser condescendente em relação à definição de estudo clínico. Entretanto, se eles pecam nos aspectos formais, em relação à legislação que surgiu posteriormente, eles foram realizados eticamente, com a melhor ciência e metodologia da época.

Para fontes de dados utilizei diversas estratégias. A primeira, visando recuperar os estudos mais antigos, foi consultar a bibliografia de alguns livros sobre histórias das vacinas, em particular sobre a vacina de febre amarela, em que o Brasil, no Instituto Oswaldo Cruz, foi pioneiro. Foram particularmente importantes: o livro de Jaime Larry Benchimol, “Febre Amarela”, 2001, com 395 referências bibliográficas (Benchimol 2001a); Anais do “Simpósio Internacional Sobre Febre Amarela e Dengue. Cinquentenário da Introdução da cepa 17D no Brasil, Rio de Janeiro, maio 15-19, 1988” (Fundação Oswaldo Cruz/Bio-Manguinhos 1988); Stanley Plotkin, “History of Vaccine Development” (Plotkin 2011), e em especial o capítulo sobre a vacina de febre amarela, de Thomas Monath, que inclui 110 referências bibliográficas (Monath 2011); o livro “Vaccines, A Biography”, de Andrew A. Artenstein, 2010, em que o capítulo sobre febre amarela, também escrito por Thomas Monath, tem 122 referências bibliográficas (Monath 2009) ; o capítulo sobre febre amarela do livro “Vaccines”, de Plotkin, Orenstein & Offit, 2013, escrito por Thomas Monath et al. (2013) com 940 referências bibliográficas.

Fiz uma busca sistemática pelo PubMed, da National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, dos Estados Unidos, utilizando os termos, em “Clinical Studies Categories”:

Therapy/Broad (filter) (AND yellow fever vaccine AND clinical Trial)
Therapy/Broad (filter) (AND measles vaccine AND Brazil AND clinical Trial)
Therapy/Broad (filter) (AND MMR vaccine AND Brazil AND clinical Trial)
Therapy/Broad (filter) (AND poliomyelitis vaccine AND Brazil AND clinical Trial)
Therapy/Broad (filter) (AND DTP/Hib vaccine AND Brazil AND clinical Trial)
Therapy/Broad (filter) (AND tetravalent vaccine AND Brazil AND clinical Trial)
Therapy/Broad (filter) (AND hepatitis B vaccine AND Brazil AND clinical Trial)
Therapy/Broad (filter) (AND meningococcus C vaccine AND Brazil AND clinical Trial)
Therapy/Broad (filter) (AND meningococcus B vaccine AND Brazil AND clinical Trial)
Therapy/Broad (filter) (AND BCG vaccine AND Brazil AND clinical Trial)
Therapy/Broad (filter) (AND smallpox vaccine AND Brazil AND clinical Trial)
Therapy/Broad (filter) (AND influenza vaccine AND Brazil AND clinical Trial)
Therapy/Broad (filter) (AND Schistosomiasis vaccine AND Brazil AND clinical Trial)
Therapy/Broad (filter) (AND Parasitic vaccine AND Brazil AND clinical Trial)
Therapy/Broad (filter) (AND malaria vaccine AND Brazil AND clinical Trial)
Therapy/Broad (filter) (AND Necator americanus vaccine AND Brazil AND clinical Trial)
Therapy/Broad (filter) (AND Leishmania vaccine AND Brazil AND clinical Trial)

Adicionalmente, pesquisei “Clinical study and leishmania and Brazil”, e repeti a pesquisa com este mesmo termo de busca, mas substituindo “leishmania” por todas as possíveis vacinas pesquisadas anteriormente, e acrescentando “HIV”.

Fiz ainda buscas pelo LILACS, a base de dados latino-americana da BIREME – OPAS/OMS, e por meio dos serviços de busca bibliográfica de teses e dissertações do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz. Recuperei as teses referentes a estudos clínicos com vacinas, e a grande maioria já havia sido publicada resumidamente em algum periódico médico. Fiz buscas por meio do “Research Gate”.

Para a recuperação dos artigos originais, utilizei, além do PubMed e do LILACS, a base de dados Scielo, os serviços do Portal dos Periódicos da CAPES, a Biblioteca da

Escola Nacional de Saúde Pública, a Biblioteca da Fiocruz, a Biblioteca do Castelo Mourisco, e a Biblioteca de Manguinhos. Adquiri fotocópias de artigos antigos por meio do Hinari Programme, da Organização Mundial de Saúde, e da Oxford Journals. Fiz também solicitações de cópias dos artigos aos autores. Consegui, assim, todos os artigos originais objeto dessa revisão e outros que foram citados. Agradeço à Casa de Oswaldo Cruz, em nome de sua Diretora, Nara Azevedo, e Nathacha Regazzini, pelas fotos, documentos, livros de referência e sugestões valiosos. Foram-me particularmente valiosos os seguintes livros: Memória de Manguinhos (Fundação Oswaldo Cruz/ Casa de Oswaldo Cruz 1991); o Fundo Instituto Oswaldo Cruz: Inventário dos Documentos das Coleções Científicas (Fundação Oswaldo Cruz/ Casa de Oswaldo Cruz 2001) e o Guia do Acervo Casa de Oswaldo Cruz (Fundação Oswaldo Cruz/ Casa de Oswaldo Cruz 2009).

Agradeço também a colaboração da Coordenadoria de Comunicação Social da Fiocruz (CCS), na pessoa de Ricardo Valverde.

Várias pessoas me ajudaram com sugestões e informações, e destaco o Prof. José Rodrigues Coura, o Dr. Akira Homma, a Dra. Cristina Possas, e muitos outros colegas, a quem muito agradeço.

Penso que dessa forma consegui obter um banco de dados bastante completo de estudos clínicos com vacinas no âmbito da Fundação Oswaldo Cruz. Ainda assim, é possível que tenha deixado de incluir algum estudo clínico que atenda aos critérios de inclusão, por inadvertência, e desde já peço compreensão.

Para ter uma melhor compreensão do contexto de cada pesquisa, reuni também ampla bibliografia histórica, mas que não faz parte sistemática da presente tese.

No caso da febre amarela, vali-me muitas vezes do livro já citado de Benchimol (2001a), que tem uma quantidade impressionante de detalhes apurados com exatidão sobre a febre amarela e sua vacina.

Em vez de seguir uma ordem cronológica rigorosa, minha proposta inicial, separei os estudos clínicos por tipo de vacina, por exemplo, febre amarela, sarampo, poliomielite, etc. Para cada vacina procurei seguir a ordem cronológica, mas sem rigidez, procurando manter uma coerência lógica na progressão e diferenciação das linhas de pesquisa.

Para cada estudo clínico incluí comentários sobre os seus aspectos mais relevantes, que incluem, de maneira muito sintética, um contexto, um resumo, principais achados, e conclusões.

A seguir, apresento uma análise do conjunto dos estudos, principalmente quanto ao racional (propósito) de cada um e à sua metodologia.

Na segunda parte dessa tese apresento a minha contribuição pessoal para o desenvolvimento de vacinas e sua utilização pelo Programa Nacional de Imunizações.

Adotei como norma para as referências bibliográficas as instruções aos autores e a formatação das *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, que são muito semelhantes, mas não exatamente iguais, às normas do Protocolo de Vancouver (*Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*). Consultando as teses de doutorado e mestrado recentes disponíveis nas bases de dados da Fiocruz, percebi que em geral as citações da bibliografia seguem a mesma orientação, isto é, as instruções aos autores das *Memórias*. A razão de minha escolha do modelo e estilo das *Memórias* é que, para os fins dessa tese, que tem muitos registros históricos e uma preocupação de resgate de documentos, esse modelo me pareceu mais adequado, por ser mais completo (todos os autores são citados nas referências bibliográficas), claro e esteticamente agradável.

5. RESULTADOS

5.1. Estudos clínicos com a vacina de febre amarela

Os estudos clínicos com a vacina de febre amarela seguiram duas linhas distintas: (1) estudos ligados primordialmente ao desenvolvimento da vacina de febre amarela e conhecimento da resposta imune específica, bem como da reatogenicidade e segurança (2) estudos imunológicos ligados primordialmente ao objetivo de prevenir os eventos adversos graves. Começaremos pelos trabalhos referentes ao subitem 1, e terminaremos com os trabalhos referentes ao subitem 2, e a seqüência cronológica será mantida dentro de cada um dos subitens.

5.1.1. Soper FL, Smith HH 1938. Yellow fever vaccination with cultivated virus and immune and hyperimmune serum. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 18:111-134.

Instituições envolvidas: Serviço Cooperativo de Febre Amarela mantido pelo Ministério da Educação e Saúde do Brasil e a Fundação Rockefeller, com a participação ativa dos Laboratórios da Divisão Internacional de Saúde da Fundação Rockefeller, New York, e dos Laboratórios da Bahia e Rio de Janeiro. Trabalhos de campo realizados em 1935, 1936 e 1937, no Rio de Janeiro, Goiás, Paraná, Mato Grosso, Maranhão e São Paulo.

Financiamento: sem informações.

Comentários. Theiler utilizou para a obtenção da vacina de febre amarela um vírus proveniente de um caso benigno de febre amarela, de um paciente de Gana, chamado Asibi, em 1927, um pouco antes da obtenção do vírus que originaria a vacina francesa. O vírus Asibi foi transmitido por inoculação intracerebral em macacos Rhesus por Stokes, Bauer e Hudson, em 1927 (Stokes et al. 1928). Theiler fez passagens seriadas do vírus Asibi no cérebro de camundongos brancos, diminuindo o seu viscerotropismo, mas aumentando seu neurotropismo (Theiler 1930a; Theiler 1930b). Essa cepa foi utilizada por Sawyer, Kitchen e Lloyd, aplicando concomitantemente soro imune, método que inviabilizava sua ampla utilização (Sawyer et al. 1932). Visando diminuir a neurovirulência, Lloyd et al. (1936) fizeram passagens do vírus Asibi em tecido embrionário de camundongos, designando essa cepa 17E, objeto desse estudo. Embora não incluía autores brasileiros, o estudo teve a participação dos laboratórios brasileiros, no Rio de Janeiro e Bahia, como parte da colaboração do Ministério da Educação e Saúde do Brasil com a Fundação Rockefeller. O método não era seguro, pois a cepa 17E era ainda demasiadamente neurovirulenta, e soros imunes humanos, de macacos rhesus e cabras foram aplicados concomitantemente. Além disso, reações alérgicas e icterícia de longo período de incubação ocorreram após a vacinação e os anticorpos administrados passivamente interferiram com a resposta imune à vacinação.

5.1.2. Smith HH, Penna HA, Paoliello A 1938. Yellow fever vaccination with cultured virus (17D) without immune serum. *Am J Trop Med Hyg* 18:437-468.

Instituições envolvidas: Serviço Cooperativo de Febre amarela, mantido pelo Ministério da Educação e Saúde do Brasil e a Divisão Internacional da Fundação Rockefeller. Minas Gerais, São Paulo e Paraguai. Fevereiro de 1937 a fevereiro de 1938.

Financiamento: sem informações.

Comentários. Os vírus da cepa 17E tinham ainda acentuada neurovirulência, como vimos, e por isso novos estudos foram realizadas pelo grupo de Theiler, visando atenuá-los. Os novos vírus vacinais foram obtidos por 58 passagens da cepa 17E em embriões de galinha, e por mais de 200 passagens adicionais em embriões de galinha destituídos de tecido nervoso, e assim se obteve a cepa vacinal 17D.

A cepa 17D causava encefalite em menos de 10% dos camundongos inoculados por via intracerebral, e em macacos, por via subcutânea ou intraperitoneal, causavam mínima viremia, sem doença clínica. A cepa 17D também não provocava encefalite fatal quando inoculada por via intracerebral em macacos. Além disso, os macacos rhesus inoculados com esse vírus por qualquer via de administração ficavam completamente imunes à injeção subsequente com cepas virulentas do vírus da febre amarela. Ainda mais, não havia reversão à neurovirulência quando o vírus vacinal era passado adicionalmente em tecido nervoso de camundongos ou de embriões de galinha. Portanto, a cepa 17D reunia as condições para uso humano sem soro imune (Theiler & Smith 1937a; Theiler & Smith 1937b; Monath 2011).

A vacina contra febre amarela utilizada nesse estudo foi produzida no Laboratório do Serviço Especial de Profilaxia da Febre Amarela, no campus do Instituto Oswaldo Cruz, segundo informam Smith, Penna & Paoliello, no artigo aqui resumido, e Benchimol (Benchimol 2001b). O Laboratório de Febre Amarela (Pavilhão Rockefeller) só foi incorporado ao Instituto Oswaldo Cruz em janeiro de 1950. Foi utilizada a subcepa 17DD, mas num nível de passagem bem diferente do atual, pois foi anterior à série EP, que foi iniciada em julho de 1938. A partir dessa data, Penna fez passagens adicionais em ovos embrionados de galinha, para melhorar o rendimento, na linhagem

EP (“egg-passage”), da qual deriva a vacina 17DD atual. Esse foi o primeiro vírus a ser mantido exclusivamente em ovos embrionados, procedimento que posteriormente foi expandido para outras subcepas (Post et al. 2001).

É possível que as primeiras pessoas tenham sido vacinadas com a NY41, mas certamente a grande maioria dos vacinados nos estudos relatados nesse trabalho recebeu a vacina da linhagem 17DD.

O estudo foi implementado gradualmente, avaliando reações adversas e imunogenicidade após cada etapa. Foram vacinadas inicialmente pessoas a partir de 12 anos, e posteriormente foram incluídas crianças a partir de 8 anos, e depois, a partir de 2 anos e gestantes.

Chama a atenção o grau de rigor científico e responsabilidade ética com que o estudo foi feito. Embora não seguisse a metodologia padronizada das exigências atuais de estudos clínicos, na prática a seqüência seguida foi a recomendada até hoje: estudos pré-clínicos e estudos clínicos com introdução gradual da vacina em grupos crescentes de pessoas, e decrescente de idade, com observação atenta dos eventos adversos. Na Figura 6, vê-se a sua implementação gradual, no período de fevereiro de 1937 a janeiro de 1938. Era a melhor ciência da época. Esse estudo é um marco na história de desenvolvimento das vacinas.

A produção brasileira da vacina 17DD de febre amarela ficou consolidada no Instituto Oswaldo Cruz, graças à determinação e competência de Henrique de Azevedo Penna e seu grupo, em colaboração com Hugh Smith e o Instituto Rockefeller.

Figura 6. Introdução gradual da vacina contra febre amarela no Brasil, fevereiro de 1937 a janeiro de 1938. Figura do artigo original.

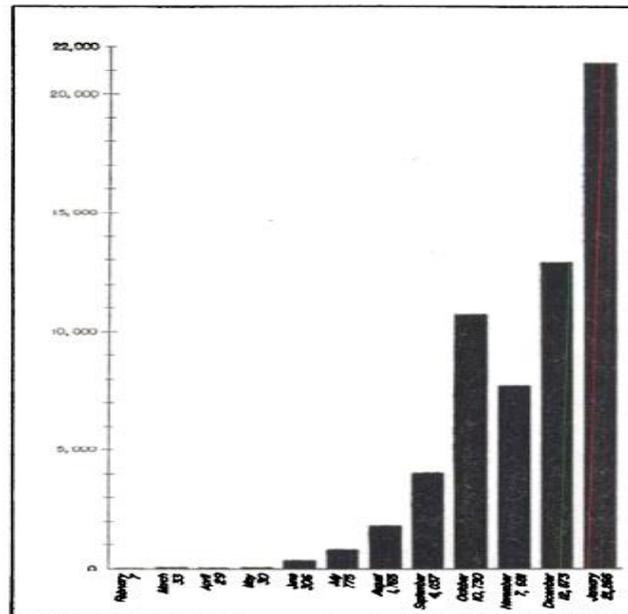


Figura 7. Henrique de Azevedo Penna



Fonte: Acervo da Casa de Oswaldo Cruz

Figura 8. Dr. H. H. Smith vacinando uma criança



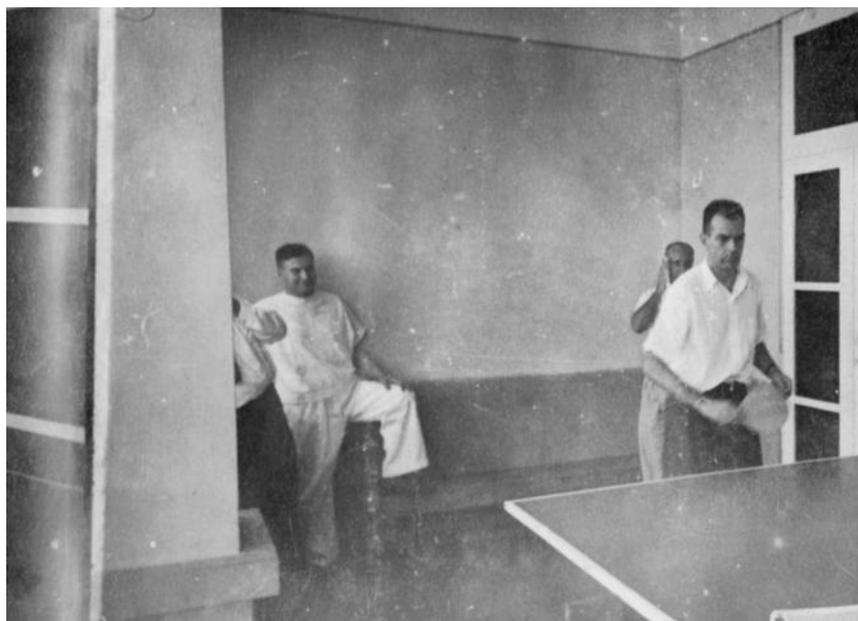
Fonte: Acervo da Casa de Oswaldo Cruz

Figura 9. Dr. Fred Soper, vacinando em Belém, Brasil, em 1943



Fonte: National Library of Medicine, EUA

Figura 10. O virologista Hilary Koprowski e Penna jogando ping pong



Fonte: Acervo da Casa de Oswaldo Cruz

Figura 11. Foto dos funcionários do Serviço de Febre Amarela e da Fundação Rockefeller



Fonte: profiles.nlm.nih.gov/ (“The Fred L Soper Papers”)

Tradução do original: “Dos 28 homens que participaram do almoço, 21 eram médicos do Serviço de Febre Amarela do Brasil, e cinco eram do *staff* da Fundação Rockefeller (FR) (...)”

Sentados, da esquerda para direita: desconhecido, Alvaro de Mello, Mario Pinotti, Allen M Walcott (FR), João de Barros Barreto, Fred L Soper (FR), Servulo Lima, D. Bruce Wilson (FR), Waldemar de Sá Antunes, e Abel Tavares de Lacerda.

De pé, da esquerda para direita: Milton Pessoa de Melo, Renan dos Reis, Sebastião Pereira Brasil, João Luiz Detzi, George Bevier (FR), João Silveira, Damasceno Costa, Raymond Shannon (entomologista da FR), Paulo Rouanet, Eduardo Leal Ferreira, Loring Whitman (FR), Octavio Pinto Severo, Ademar Paoliello, Mario Franca, Rubens Marques, Luiz Lessa, Hugh Smith (FR) e Oswaldo José da Silva.

5.1.3. Fox JP, Manso C, Penna HA, Pará M 1942. Observations on the occurrence of icterus in Brazil following vaccination against yellow fever. *Am J Hyg* 36:68-116.

Instituições envolvidas: Divisão de Saúde Internacional da Fundação Rockefeller e o Ministério da Saúde e Educação do Brasil. Rio de Janeiro e Espírito Santo, maio de 1939 a maio de 1940.

Financiamento: sem informações.

Comentários. O aparecimento de icterícia entre pessoas vacinadas contra febre amarela já havia sido observado na Inglaterra, por Findlay e MacCallum (Findlay & MacCallum 1937) e no Brasil, por Soper e Smith (1938, v. 5.1.1.). Em 1936 e 1937, quando a icterícia foi observada, a vacina era administrada em conjunto com soro de origem humana ou animal. Posteriormente, a vacina foi aplicada sem suplemento de soro imune. Entretanto, o soro humano normal continuou a ser utilizado no preparo da vacina de febre amarela e nas culturas de tecido em que o vírus era mantido. O objetivo desse artigo refere-se à investigação de icterícia após a vacina de febre amarela no Espírito Santo e Campos, no Estado do Rio de Janeiro. Os autores, após minuciosa investigação epidemiológica, fizeram uma longa discussão sobre possíveis causas, mas não conseguiram tirar conclusões definitivas. Apontaram, entretanto, para a compatibilidade de seus achados com a conclusão de Findlay, de que a icterícia foi causada por um vírus contaminante, que entrou na vacina por meio do soro humano, utilizado na preparação da vacina.

Henrique Penna encontrou a solução para esse problema. A técnica que desenvolveu para produção da vacina extraíndo o embrião do ovo com uma tocha de óxi-acetileno prescindia da adição de soro humano (Penna 1939). Chama a atenção a falta de proteção das mãos na manipulação de espécimes, erro grave que deve ter causado muitas das infecções e mortes com o vírus da febre amarela em laboratórios (Figura 12).

Figura 12. Abrindo a casca do ovo com tocha de óxi-acetileno. Foto do artigo original de Penna



Figura 13. Dr. José Francisco de Madureira Pará, Chefe do Laboratório de Histopatologia



Fonte: Acervo da Casa de Oswaldo Cruz

Figura 14. Drs. Caio de Souza Manso e Nelson Caryl Davis, jogando ping pong, no Serviço de Febre Amarela.



Fonte: Acervo da Casa de Oswaldo Cruz

5.1.4. Fox JP, Kossobudzki SL, Cunha JF 1943. Field studies on the immune response to 17D yellow fever virus. *Am J Hyg* 38:113-138.

Instituições envolvidas: Serviço de Estudos e Pesquisas sobre a Febre Amarela, mantida pelo Ministério da Saúde e Educação do Brasil e a Divisão de Saúde Internacional da Fundação Rockefeller. Belo Horizonte (setembro de 1940), Pouso Alegre (final de 1940) e Silvianópolis (fevereiro de 1941), todos em Minas Gerais.

Financiamento: sem informações.

Comentários. Como vimos em 5.1.3., em virtude do surto de icterícia entre maio de 1939 e maio de 1940, foi recomendada a implementação de um sistema de lote-semente para a produção da vacina de febre amarela a partir de uma cepa preparada sem soro humano e não icterogênica (ainda não estava claro para os pesquisadores a verdadeira causa da icterícia pós-vacinal, que na verdade não estava relacionada à cepa). Outra razão foi a constatação, em 1938-1939, de que alguns lotes tinham menor imunogenicidade após um número mais elevado de passagens (subcepa *17DDhigh*). Embora publicado após o estudo seguinte (v. 5.1.5), os estudos aqui relatados foram realizados anteriormente. O trabalho relata três experimentos visando a escolha e introdução de uma nova subcepa. No estudo em Belo Horizonte, escolheu-se a nova subcepa (17D-NY-104). Nos estudos de Pouso Alegre e Silvianópolis foram feitos um estudo de dose-resposta e um estudo comparando vias de administração (IM, SC, ID) com a nova subcepa. A afirmativa de que doses de vacina têm uma correlação inversa com título de anticorpos pós-vacinais não pode ser deduzida dos dados apresentados e parece ser um equívoco. A escolha da cepa 17D-NY 104 para ser o novo lote-semente também mostrou-se equivocada, como veremos adiante. A utilização de soro humano no experimento de Belo Horizonte e de Silvianópolis mostra que os autores não acreditavam ainda na hipótese de que o soro humano era responsável pela icterícia pós-vacinal. Como não ocorreu icterícia nos experimentos com a cepa 17D-NY 104, mesmo com a utilização de soro humano, isso deve ter contribuído para a resistência do grupo americano em aceitar o soro humano como causa de icterícia, e na escolha desse lote para novo lote-semente. Ainda assim,

esses estudos são importantes, mostram que a escolha do lote-semente seguiu uma pesquisa metódica, e contém informações valiosas até para os dias de hoje.

Figura 15. José Fonseca da Cunha, colegas e amigos de Bio-Manguinhos e do Instituto Ataulpho de Paiva. José Fonseca da Cunha é o primeiro à esquerda. O segundo e o terceiro a partir da direita são Luiz Alberto Pereira e Yone da Silva Motta



Foto por cortesia de Luiz Alberto Pereira

5.1.5. Fox JP, Lennette EH, Manso C, Aguiar JRS 1942. Encephalitis in man following vaccination with 17D yellow fever virus. *Am J Hyg* 36:117-142.

Instituições envolvidas: Serviço de Pesquisa de Febre Amarela e do Serviço Nacional de Febre Amarela do Brasil. O primeiro mantido conjuntamente pelo Ministério da Saúde e Educação do Brasil e a Divisão de Saúde Internacional da Fundação Rockefeller. Julho de 1941.

Financiamento: sem informações.

Comentários. Theiler et al. no Instituto Rockefeller desenvolveram uma vacina menos neurovirulenta (cepa 17D), por passagens sucessivas em embriões de galinha dos quais o cérebro e medula espinhal haviam sido retirados. A vacina utilizada em Minas Gerais, objeto desse estudo, era derivada da cepa 17D-NY 104, escolhida após os estudos revisados em 5.1.4. Entretanto, a escolha não foi feliz. Em julho de 1941 foram notificados casos de encefalite em Guanhães, Minas Gerais, após o uso de vacinas derivadas do lote-semente preparado a partir da subcepa 17D-NY 104. Isso levou a uma investigação ampla sobre encefalite após a vacina de febre amarela 17D.

Os resultados dessa investigação deixaram claro que os casos de meningoencefalite se deviam à vacinação. Todos os lotes utilizados em Guanhães eram preparados da mesma maneira e provenientes do mesmo lote semente, e mais de 90.000 doses de lotes da mesma série haviam sido utilizados em vários outros locais de Minas Gerais e Espírito Santo, bem como mais de 12.000 pessoas na Bolívia, antes de julho de 1941, sem relatos de eventos adversos neurológicos. O governo da Bolívia foi avisado, houve investigações, sem que casos semelhantes fossem registrados. Apesar desses achados discrepantes, os autores concluíram que o lote semente da subcepa 17D-NY 104 precisava ser substituído. Isto levou ao estudo de Guaxupé, que incluiu quatro novas subcepas: NY 310, E750, E 751 e E 752. Não obstante, a essas se acrescentou um lote (E718, proveniente do 17D-NY 104) já usado em Guanhães e outro lote (lote 0) preparado a partir de embrião de galinha não infectado (placebo). Esses seis lotes foram usados simultaneamente durante 3 semanas para vacinar 19.000 pessoas. Destes, 14.770 foram seguidos para eventos adversos. O lote 718 (17D-NY 104) foi, novamente, implicado pela maior parte dos

casos neurológicos pós-vacinais, com 49 casos em 5.946 vacinados (0,82%), cerca do dobro observado em Guanhães.

Os pesquisadores, apesar das dificuldades, conseguiram realizar estudos notáveis, que permitiram uma conclusão segura sobre a responsabilidade da cepa 17D-NY 104. A utilização em Guaxupé do lote E718, proveniente do 17D-NY 104) já usado em Guanhães, é questionável eticamente, mas isso é amenizado pela disparidade de informações de vigilância de eventos adversos, mormente a ausência de casos notificados de encefalite na Bolívia. Esse tema, a disparidade de informações epidemiológicas, é recorrente.

Selecionou-se para substituir a subcepa 17D NY 104 a subcepa 17D NY 310, derivada da subcepa Colombia 88. As subcepas 17D NY 310 e 17D NY 318 foram utilizadas no Brasil durante alguns períodos em 1941 e em 1942, e depois foram abandonadas. Voltou-se então a utilizar a subcepa 17DD, linhagem EP, derivada da 17DD/low, no sistema de lote-semente, estabelecido por Henrique de Azevedo Penna e seu grupo no Instituto Oswaldo Cruz. Atualmente está no nível de passagem 286-287.

Ambas as linhagens, 17D e 17DD, são derivadas do vírus Asibi, e compartilham uma homologia de 99,2% das seqüências nucleotídicas (Stock et al. 2012).

5.1.6. Fox JP, Cabral AS 1943. The duration of immunity following vaccination with the 17D strain of yellow fever virus. *Am J Hyg* 37:93-120.

Instituições envolvidas: Serviço de Estudos e Pesquisas sobre a Febre Amarela, mantido conjuntamente pela Divisão Internacional de Saúde da Fundação Rockefeller e pelo Ministério da Saúde e Educação do Brasil.

Financiamento: sem informações.

Comentários. Os estudos incluíram pessoas com vacinações em tempos variados, durante quatro anos. Foram estabelecidos, pela primeira vez, critérios de inclusão. Análise detalhada destes resultados por idade revelaram, com uma única exceção parcial, uma correlação bem marcada entre idade e nível de imunidade, tanto um mês após a vacinação quanto em maiores intervalos, sendo que níveis particularmente baixos foram encontrados em soros de pessoas com menos de 10 anos de idade no momento da vacinação. Assim, parece provável que a idade pode ser um fator importante na determinação não só da resposta imune imediata quanto da duração subsequente da imunidade das pessoas imunizadas contra febre amarela.

Soros sem ação protetora nos testes de rotina foram reexaminados por uma técnica mais sensível. Dessa maneira, anticorpos detectáveis foram revelados em 86 (61,8%) dos 139 soros reexaminados. Embora técnicas ainda mais sensíveis pudessem revelar a presença de anticorpos em alguns dos soros remanescentes, essas observações sugerem que imunidade sorologicamente demonstrável contra febre amarela, induzida por vírus vivos 17D, pode desaparecer completamente, pelo menos em alguns casos.

A vacinação contra febre amarela resulta na persistência de um estado imune que é claramente satisfatório do ponto de vista de grupo durante pelo menos quatro anos e provavelmente por muito mais tempo, já que a taxa de declínio é muito pequena.

Figura 16. Vacinação em área rural. Fonte: Acervo da Casa de Oswaldo Cruz



Fonte: Acervo da Casa de Oswaldo Cruz

Figura 17. Atestado de vacinação contra febre amarela

ESTADO BRASILEIRO — S. S. S. — S. S. S.

SECRETARIA DE SAUDE

Estado	Paulista
Município	Paulista
Distrito	Santa
Local	Fabrica Paulista
Data	12.10.46. Nº Prep. 2º
Hora Reh.	10.40. Um. inoc. 11.15
Nº Lote	778. Quant. c.c 0,3
Diluição	1:50 Total Vac. 50
Nº de dias sem gelo	0
Dr. Milton Guedes Albuquerque Assinatura	

00 A. 3
100000-500

Fonte: Acervo da Casa de Oswaldo Cruz

5.1.7. Fox JP, Cunha JF, Kossobudzki SL 1948. Additional observations on the duration of immunity following vaccination with the 17D strain of yellow fever virus. *Am J Hyg* 47:64-70.

Instituições envolvidas: Serviço de Estudos e Pesquisas sobre a Febre Amarela, mantido conjuntamente pela Divisão Internacional de Saúde da Fundação Rockefeller e pelo Ministério da Saúde e Educação do Brasil.

Financiamento: sem informações.

Comentários. O estudo anterior havia mostrado que a imunidade após a vacinação de febre amarela em adultos era mantida muito satisfatoriamente durante quatro anos, mas em crianças a resposta à vacinação era menos satisfatória e era evidente um declínio mais rápido da imunidade ao longo do tempo. O presente estudo incluiu pessoas do grupo de Pouso Alegre, com pessoas de todas as idades, e o grupo de Varginha, composto somente de adultos, já estudados anteriormente em 5.1.6. O grupo de Pouso Alegre havia recebido anteriormente a vacina 17D-NY 104, e o de Varginha a 17DD. Embora os dados adicionais do presente estudo não revelem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de idade mais velhos e mais jovens, as diferenças observadas estão de acordo com as conclusões anteriores, e no caso de intervalos de dois anos se aproximam de significância estatística ($0,1 > P > 0,05$). Esses resultados estão em aparente contradição com os de uma pesquisa de imunidade após vacinação contra febre amarela na África, que não mostrou diferenças no percentual de pessoas imunes com 14 anos ou menos e 15 anos ou mais (Smithburn & Mahaffy 1945). Estudos na Colômbia não mostraram diferenças significativas de proteção por idade, embora houvesse menor proporção de imunes em crianças (Anderson & Gast-Galvis 1947). Até hoje a imunidade menor em crianças é matéria de discussão, mas acumularam-se evidências de que a imunogenicidade da vacina de febre amarela é menor em crianças do que em adultos, pelo menos no Brasil (Stefano et al. 1999; Collaborative group for studies with YFV, 2007; Silva et al. 2011). Como não se dispõe de um correlato sorológico de proteção contra febre amarela, essa é uma questão difícil de resolver.

5.1.8. Groot H, Ribeiro RB 1962. Neutralizing and haemagglutination-inhibiting antibodies to yellow fever 17 years after vaccination with 17D vaccine. *Bull Wild Hlth Org* 27:699-707. Pouso Alegre, 1958.

Instituições envolvidas: Governo da Colombia, OPAS e Departamento de Endemias Rurais do MS/Brasil.

Financiamento: Governo da Colombia e OPAS

Comentários. Após o estudo anterior, somente 10 anos depois, em 1958, surge um novo estudo com a vacina de febre amarela, também relacionado com a duração da imunidade. Na verdade, as informações básicas sobre a imunogenicidade e segurança da vacinação contra febre amarela e o processo de produção já haviam sido estabelecidos, e a duração da imunidade era a questão remanescente. Groot e Ribeiro foram a Pouso Alegre em 1958, para averiguar a imunidade das pessoas vacinadas com a vacina 17D entre 27 de dezembro de 1940 e 5 de fevereiro de 1941, isto é, 17 anos depois. Essas pessoas não haviam sido revacinadas, e Pouso Alegre era considerada uma área livre de febre amarela, possivelmente em virtude da elevada altitude, cerca de 1.100 metros. O estudo inicial foi feito com a vacina 17D-NY 104. Foi estudada a duração da imunidade da vacina contra febre amarela de cento e oito pessoas vacinadas desde um ano de idade até mais de 50 anos. Houve evidências de que a imunidade das pessoas vacinadas 17 anos antes persistiu pelo teste de neutralização em 97% dos casos, mas somente em 76% dos casos os testes foram fortemente positivos. A positividade pelos testes de inibição da hemaglutinação foi muito menor. Esse estudo confirma a imunidade em longo prazo da vacina contra febre amarela e a superioridade dos testes de neutralização sobre os inibidores da hemaglutinação. A subcepa da vacina utilizada no estudo inicial era derivada do lote semente 17D-NY 104 (v. 5.1.4), que foi abandonado, por ser neurotrópico (v. 5.1.5.). A aplicação desses resultados à vacina 17DD é questionável.

5.1.9. Lopes OS, Guimarães SSDA, Carvalho R 1988. Studies on yellow fever vaccine III – dose response in volunteers. *J Biol Stand* 16:77-82.

Instituições envolvidas: Bio-Manguinhos/Fiocruz e Instituto Adolfo Lutz e pelo *International Development Research Center, Canada*.

Financiamento: *International Development Research Center, Canada*.

Comentários. Escassearam os recursos para produção da vacina de febre amarela, que se manteve a duras penas, graças à responsabilidade e dedicação de Alberto Romeu Nicolau, e assim mesmo com a ajuda financeira modesta, mas importante, da Organização Pan-Americana de Saúde. Somente cerca de 30 anos depois do estudo anterior surgem novos estudos clínicos com a vacina de febre amarela no âmbito da Fundação Oswaldo Cruz, solicitados pelo então Diretor de Bio-Manguinhos, Akira Homma, em comum acordo com Francisco Pinheiro, da Organização Pan-Americana de Saúde. Já tinham sido feitos melhoramentos tecnológicos, como o uso de ovos SPF (specific pathogenic free, livres de contaminação por patógenos específicos), fluxo laminar para produção, mudança do processo de liofilização, introdução de células Vero para titulação, etc, mas a qualidade só era avaliada no produto final. Esse grupo inicialmente estabeleceu os parâmetros que permitissem controlar a qualidade da vacina nas diferentes etapas de produção (Lopes et al. 1987, Lopes et al. 1988a). Era ainda necessário estabelecer um diluente para a vacina que maximizasse a manutenção de sua potência em temperatura ambiente e realizar estudos de termoestabilidade. Esse grupo verificou que a água destilada conferia melhor estabilidade à vacina do que o soro fisiológico ou PBS (tampão fosfato-salino ou phosphate buffered saline). A vacina era um pouco mais dolorosa, mas nada muito significativo, pois a dor desaparecia em alguns minutos. Após todas essas modificações, era necessário realizar um estudo clínico, para, entre outros objetivos, comparar as unidades formadoras de placas contadas nas células Vero com a dose letal em camundongos (LD_{50}) e estabelecer a imunogenicidade da vacina em diferentes doses.

Esse estudo mostrou que com cerca de 200 PFU (cerca de 600 LD_{50}) ou mais há soroconversão em 100% dos participantes, enquanto que com 100 PFU

(correspondendo a 300 LD₅₀) 93,7% dos participantes soroconverteram. A dose de 1.000 PFU (como é recomendado pela OMS) ou seu correspondente em LD₅₀ é mais do que suficiente para imunização humana. Esses estudos de Lopes e colaboradores são notáveis, pela sua abrangência, racionalidade, e cuidados na realização. Suas conclusões são semelhantes às que obtivemos em novo estudo de dose-resposta publicado em 2013, com maior amostragem, também realizado por solicitação de Akira Homma, além do Ministério da Saúde, e que será revisado um pouco mais adiante (V. 5.1.16). Esse é o primeiro estudo com a vacina de febre amarela no Brasil que fala em “voluntários”, mas ainda não se refere a “termo de consentimento”.

Figura 18. Oscar Lopes, Suely Guimarães e Ricardo de Carvalho



Foto por cortesia de Ricardo de Carvalho

Figura 19. Dr. Alberto Romeu Nicolau inoculando um macaco



Foto por cortesia de Ricardo de Carvalho

Figura 20. Akira Homma, Diretor de Bio-Manguinhos na época desse estudo



5.1.10. Stefano I, Sato HK, Pannuti CS, Omoto TM, Mann G, Freire MS, Yamamura A MY, Vasconcelos PFC, Oselka GW, Weckx LW, Salgado MF, Noale LFO, Souza VAUF 1999. Recent immunization against measles does not interfere with the sero-response to yellow fever vaccine. *Vaccine* 17:1042-1046.

Instituições envolvidas: Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, SP, Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Fiocruz-Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ e Instituto Evandro Chagas, Belém, PA.

Financiamento: sem informações.

Comentários. A recomendação genérica para evitar o uso de vacinas virais atenuadas diferentes em intervalos inferiores a quatro semanas levou à interrupção temporária de atividades de vacinação de rotina com outras vacinas virais atenuadas por 60 dias (30 dias antes e 30 dias depois) por ocasião de campanhas de vacinação em massa, embora com muito pouco respaldo de estudos clínicos. Entretanto, devido à reintrodução do *Aedes aegypti* e à ocorrência de surtos de sarampo, essas vacinas foram muitas vezes, por razões operacionais, administradas com intervalos inferiores a 30 dias, criando inquietações nas equipes de saúde. O objetivo desse estudo foi determinar se vacinação recente contra sarampo interfere com a resposta imune à vacina de febre amarela. O estudo tinha critérios de inclusão e exclusão. Foram incluídas crianças de nove meses de idade, que se vacinaram contra febre amarela em intervalos variados após a vacina de sarampo. O delineamento do estudo e os métodos foram aprovados pelo Comitê Consultor de Imunizações do Departamento de Saúde do Estado de São Paulo. Obteve-se consentimento informado dos pais das crianças envolvidas no estudo. As taxas de soroconversão (SC) e os títulos médios geométricos foram similares, sem diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos. Os autores concluíram que a administração prévia da vacina contra sarampo não deve representar um contraindicação formal para a vacinação contra febre amarela.

Até a época desse estudo, o uso simultâneo ou combinado de vacina de febre amarela e outras vacinas virais vivas havia sido investigado, quanto à vacina anti-variólica, antivariólica e sarampo, antivariólica, sarampo e BCG, ou apenas sarampo. Com exceção de uma vacina combinada febre amarela, antivariólica e sarampo, aplicada por injeção a jato (sem agulha), em que a soroconversão para febre amarela possivelmente diminuiu, nos outros estudos não se observou prejuízo na imunogenicidade da vacina de febre amarela ou das outras, aplicadas simultaneamente ou de maneira combinada, isto é, vacinas aplicadas com a mesma injeção (Monath et al. 2013). A amostragem relativamente pequena faz com que os intervalos de confiança das SCs sejam muito amplos, dificultando conclusões. A soroconversão global, 77,5%, é relativamente baixa, quando se compara com as taxas de SC em adultos. Voltaremos a essas questões mais adiante.

Do ponto de vista metodológico esse trabalho mostra um avanço sobre os anteriores. O trabalho é estruturado adequadamente. Há itens para introdução, delineamento de estudo, critérios de inclusão e exclusão, descrição das vacinas, métodos sorológicos e estatísticos, resultados, discussão, referências. Fala-se pela primeira vez em termo de consentimento informado, mas não há ainda referência a aprovação por Comissão de Ética. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê Consultor de Imunizações do Departamento de Saúde do Estado de São Paulo. Vale notar que a primeira portaria do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisa clínica é de 10 de outubro de 1996 (Resolução 196/96), e no seu item VII diz: "Toda pesquisa envolvendo seres humanos deverá ser submetida à apreciação de um Comitê de Ética em Pesquisa". Uma deficiência importante é que não se define o critério de soroconversão para febre amarela.

5.1.11. Freire MS, Carvalho R, Yamamura AMY, Almeida LFC, Santos HHL, Borges MBJ, Mann GF 2002. Seroconversion following vaccination with the 17DD substrain of yellow fever virus. *Virus Reviews and Research* 7:51-56.

Instituições envolvidas: Bio-Manguinhos/Fiocruz

Financiamento: sem informações.

Comentários. O lote-semente original de 1942 (lote 774) estava na EP (“egg passage”) 40. Em 1962 (EP 41, lote P3) e em 1984 (EP 42, lote 102/84) foram produzidos novos lote-semente. O estudo foi feito com este último lote (informação pessoal do primeiro autor do artigo), que já estava livre do vírus da leucose aviária, e a sua produção obedecia aos requerimentos mínimos da Organização Mundial de Saúde, incluindo termoestabilidade. Noventa e três participantes sadios foram incluídos, após termo de consentimento. Dentre 58 participantes vacinados pela primeira vez, houve 100% de soroconversão (aumento de 4 vezes ou mais nos níveis de anticorpos). No grupo de indivíduos vacinados nos últimos 10 anos, alguns tinham níveis baixos de anticorpos na pré-vacinação. Esse estudo, embora pequeno, traz algumas observações interessantes sobre a resposta imunológica em indivíduos naïve para febre amarela ou com vacinação prévia, e traz algumas dúvidas sobre a manutenção da proteção durante 10 anos após a vacinação.

Figura 21. Marcos da Silva Freire



5.1.12. Camacho LAB, Freire MS, Leal MLF, Aguiar SG, Nascimento JP, Iguchi T, Lozana JA, Farias RHG, e Grupo Colaborativo para o estudo das Vacinas de Febre Amarela 2004. Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17DD yellow fever vaccines: a randomized trial. *Rev Saúde Pública* 38:671-678.

Instituições envolvidas: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos, Fiocruz e Instituto de Biologia do Exército.

Estudo aprovado pelas Comissões de Ética das instituições participantes.

Financiamento: Fiocruz, CNPq.

Comentários. A vacina de febre amarela 17DD é produzida no sistema de lote-semente desde 1942, como detalhamos anteriormente (5.1.4. e 5.1.5.). Novos lotes-semente tiveram que ser produzidos, devido ao esgotamento dos lotes anteriores. V. Figura 22, construída a partir de informações de Ricardo de Carvalho.

Além disso, eventos adversos graves com a vacina 17DD foram relatados a partir de 1999, ainda utilizando a subcepa 102/84 (Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde 2000; Vasconcelos et al. 2001), o que motivou estudos moleculares e em animais, visando estudar a segurança e imunogenicidade da vacina com a nova subcepa (Galler et al. 2001; Marchevsky et al. 2006).

Embora esses estudos fossem tranquilizadores em relação à manutenção das características atenuadas da vacina e de sua estabilidade genética, impunha-se um estudo clínico de imunogenicidade e segurança da vacina de febre amarela produzida em Bio-Manguinhos com o novo lote-semente, comparando-a com a vacina produzida com o lote anterior e com uma vacina referência internacional. O estudo em apreço teve o objetivo de testar a equivalência de três vacinas quanto à soroconversão e títulos médios geométricos para febre amarela, realizado em unidades militares do Rio de Janeiro. O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz e do Exército. Critérios de inclusão e exclusão foram explicitados. Estudo de quatro braços: (1)vacina 17DD-013Z (novo lote-semente), (2)17DD-102/84 (lote em uso no momento do estudo), (3)vacina 17D-213/77 (vacina preparada com o lote-

semente da Organização Mundial de Saúde) e (4)placebo. Foram incluídos 1.087 participantes, predominantemente adultos masculinos jovens.

As soroconversões foram um pouco menores no sexo feminino (n= 54; 95,5%) do que no masculino (99,3%), e os TMGs foram de 17,9 UI/mL no sexo feminino e 17,8 UI/mL no masculino. Considerando soroconversão como aumento de quatro vezes nos títulos, as SCs foram de 96,6%, 98,4%, 98,5% e 2,1% para as vacinas 17DD-013Z, 17DD-102/84, 17D-213/77 e placebo, respectivamente (somente os soronegativos antes da vacinação). As viremias foram encontradas em 2,7% dos vacinados, 2,2% dos que receberam 17DD e 3,7% dos que receberam 17D, de 3 a 7 dias após a vacinação. Os resultados de reatogenicidade foram também favoráveis, e são apresentados no estudo seguinte. Em conclusão, as três vacinas mostraram imunogenicidade semelhante, e a vacina preparada com o novo lote-semente foi considerada apta para substituir a vacina em uso naquele momento.

Figura 22. Derivação da vacina de febre amarela, linhagens 17D e 17DD

SC*	Linhagem 17D	Linhagem 17DD	EP**
0	ASIBI		
180	17D		
195	→	17DD	
204	17D - 204	↓	
228	Colombia 88***		
243			0
283		Lote 774 (1942)	40
284		Lote P3 (1962)	41
285		Lote 102 (1984)	42
286		Lote 993FB013Z (1999)	43
287		Lotes atuais	44

*Subcultura; **Passagens em ovos no Instituto Oswaldo Cruz; ***Todas as subcepas 17D em uso atualmente (exceto 17DD) são derivadas da subcepa Colombia 88, subculturas 235-240, e não são mostradas na Figura.

Figura 23. Ricardo Galler



Figura 24. Renato Marchevsky



5.1.13. Camacho LAB, Aguiar SG, Nascimento JP, Freire MS, Leal MLF, Iguchi T, Lozana JA, Farias RHG, e Grupo Colaborativo para o estudo das Vacinas de Febre Amarela 2005. Reactogenicity of yellow fever vaccines in a randomized, placebo-controlled trial. *Rev Saúde Pública* 39:413-420.

Instituições envolvidas: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos, Fiocruz e Instituto de Biologia do Exército.

Estudo aprovado pelas Comissões de Ética das instituições participantes.

Financiamento: Fiocruz, CNPq.

Comentários. Estudo dos eventos adversos a vacinas de febre amarela, descritas no estudo anterior. Em relação às transaminases, não houve diferenças entre os grupos que receberam vacina e o grupo que recebeu placebo. Viremia foi detectada em 2,7% (22/815) dos indivíduos vacinados, entre o 3º e o 7º dia após a vacinação; 3,5% (21/596) em indivíduos soronegativos para febre amarela antes da vacinação e 0,5% (1/197) dos que eram soropositivos antes da vacinação ($p = 0,024$). Por grupo vacinal, as viremias foram 3% (17DD-013Z), 3,6% (102/84), e 6% (17D-213/77). Eventos adversos sistêmicos foram 1,5 vezes mais freqüentes entre os que tiveram viremia ($p = 0,213$). Em conclusão, a freqüência de eventos adversos após a vacinação contra febre amarela foi semelhante entre as diversas subcepas 17D e 17DD testadas, e não houve evidência de viscerotropismo do vírus vacinal.

Esse estudo e o anterior mostram uma progressão nos atendimentos dos requisitos metodológicos e éticos: protocolo aprovado por Comissão de Ética, critérios de inclusão e exclusão, cálculo de amostragem, randomização, cegamento, uso de placebo, descrição das vacinas, critérios de avaliação da imunogenicidade, métodos de coleta de dados, plano de análise estatística, resultados, discussão, conclusão, referências bibliográficas. É o único estudo que comparou a reatogenicidade das vacinas de febre amarela com placebo, e vai ser difícil fazer outros, pois as Resoluções CFM Nº 1.885, de 23 de outubro de 2008, e CNS Nº 404, de 1º de agosto 2008, vedam aos médicos participarem de estudos clínicos com placebo, se houver métodos

provados de profilaxia, diagnóstico ou tratamento. Entretanto, esse estudo foi ético, embora usasse placebo, e haja método provado de profilaxia.

Figura 25. Luiz Antonio Bastos Camacho



Luiz Antonio Bastos Camacho está à direita; à esquerda, Artur Muloliwa, médico de Moçambique, que foi aluno do curso de Doutorado da ENSP/Fiocruz

5.1.14. Melo AB, Silva MPC, Magalhães MCF, Gil LHV, Carvalho EMF, Braga-Neto UM, Bertani GR, Marques Jr ETA, Cordeiro MT 2011. Description of a Prospective 17DD yellow fever vaccine cohort in Recife, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 85:4, 739-747.

Instituições envolvidas: Laboratório de Virologia e Terapêutica Experimental, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife; Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco; *Department of Electrical Engineering, Texas A & M University; Center for Vaccine Research, Department of Infectious Diseases and Microbiology, University of Pittsburg, USA;* Laboratório Central de Saúde Pública, Secretaria de Estado de Pernambuco.

Estudo aprovado pela CONEP/MS.

Financiamento: *National Institute of Allergy and Infectious Diseases; Fiocruz; National Science Foundation Award; CNPq; CAPES.*

Comentários. Os estudos de duração da imunidade anteriores envolveram várias subcepas, e somente os estudos de Freire et al. (5.1.11.) foram feitos com a subcepa 17DD atual, mas com pequena amostragem. Portanto, havia e há necessidade de estudos adicionais de duração da imunidade com a subcepa 17DD. Além disso, as interações entre imunidade a dengue, sexo, e resposta imunológica à vacina de febre amarela são mal conhecidos, o que torna de grande interesse o estudo de Melo et al. em epígrafe. O estudo inclui uma parte prospectiva e outra retrospectiva. Na parte prospectiva, foi avaliada a soroconversão IgM e IgG e o título de anticorpos neutralizantes em primovacinados para febre amarela. Na parte retrospectiva foi avaliada a duração da imunidade de indivíduos que já tinham sido vacinados. Foram vacinados com a vacina de febre amarela e acompanhados prospectivamente 238 indivíduos de 14 a 79 anos, dos quais 86 (36,1%) eram do sexo feminino e 152 (63,9%) do sexo masculino. Nenhum dos participantes tinha anticorpos neutralizantes contra febre amarela antes da vacinação. Após a vacinação, IgM para febre amarela foi positiva em 70,6% dos participantes e IgG em 98,3%. Todos os participantes ficaram soroprotetidos. Dos 238 indivíduos, 86,6% tinham anticorpos IgG contra dengue, mas a presença de anticorpos anti-dengue não interferiu de maneira estatisticamente significativa com o desenvolvimento dos anticorpos neutralizantes. A

duração da imunidade foi estudada retrospectivamente, em outro grupo de 60 voluntários vacinados anteriormente, em 40 dos quais a duração da imunidade foi avaliada para um período de cinco anos após a vacinação, e em 20 a duração da imunidade foi avaliada para um período de dez anos. Anticorpos neutralizantes em nível considerado protetor foram encontrados em todos os 60 participantes. Esse é o segundo estudo de duração da imunidade com a vacina 17DD, e embora dê informações que apontam para imunidade duradoura, houve queda do nível de anticorpos ao longo do tempo, reforçando a recomendação de revacinar a cada 10 anos. A amostra pequena dos grupos estudados por cinco e 10 anos após a vacinação aponta para a necessidade de estudos adicionais, em especial com indivíduos vacinados na infância. O quadro seguinte, organizado por nós, mostra um resumo dos estudos de duração da imunidade da vacina de febre amarela realizados no Brasil. Somente os dois últimos foram feitos com a vacina 17DD atualmente em uso. A OMS definiu (WHO 2013) que apenas uma dose é suficiente para proteção por toda a vida, posição bastante ousada e que tem dado margem a controvérsias. Entendemos que, pelo menos para as regiões endêmicas, há necessidade de mais estudos antes de adotarmos tal recomendação (Martins & Homma 2014).

Tabela 1. Sumário de estudos de duração da imunidade da vacina de febre amarela realizados no Brasil

Estudo	Autores	Título	Subcepa	Observações
5.1.2. (1)	Smith HH, Penna HA, Paoliello A	Yellow fever vaccination with cultured virus (17D) without immune serum.	17DD, mas não era ainda da série EP	22 participantes, 1 ano após vacinação, MG
5.1.4. (2)	Fox John P, Kossobudzki Simão Luti, Cunha José Fonseca	Field studies on the immune response to 17D yellow fever virus	17D-NY 104	167 participantes, 1 ano após vacinação, em Silvianópolis, MG
5.1.6. (3)	Fox John P, Cabral Antonio S	The duration of immunity following vaccination with the 17D strain of yellow fever virus	17D <i>low</i> , 17DD <i>low</i> , 17DD <i>high</i> .	926 participantes, até 4 anos após vacinação
5.1.7. (4)	Fox John P, Cunha José Fonseca da, Kossobudzki Simão Luti	Additional observations on the duration of immunity following vaccination with the 17D strain of yellow fever virus	Pouso Alegre: 17D-NY 104 Varginha: 17DD, ainda não era EP.	Pouso Alegre: 195 participantes (2 anos após vacinação) Varginha: 78 participantes (6 anos após vacinação)
5.1.8. (5)	Groot Hernando, Ribeiro Rubem Bahia	Neutralizing and haemagglutination-inhibiting antibodies to yellow fever 17 years after vaccination with 17D vaccine	Pouso Alegre: 17D-NY 104	108 participantes vacinados 17 anos antes
5.1.11. (6)	Freire Marcos S	Seroconversion following vaccination with the 17DD substrain of yellow fever virus	Rio de Janeiro: 17DD lote-semente 102/84	35 participantes vacinadas 3 meses a 25 anos antes, todos mostraram algum nível de inibição de placas na pré-vacinação
5.1.14. (7)	Melo AB et al.	Description of a Prospective 17DD yellow fever vaccine cohort in Recife, Brazil. Am J Trop Med Hyg 2011; 85:4, 739-47	Recife, 17DD	40 participantes, vacinados 5 anos antes, 25% soronegativos. 20 participantes, vacinados 10 anos antes, 35% soronegativos

5.1.15. Silva JRN, Camacho LAB, Siqueira MM, Freire M, Castro YP, Maia MLS, Yamamura AMY, Martins RM, Leal MLF, e Grupo Colaborativo para o Estudo das Vacinas de Febre Amarela 2011. Mutual interference on the immune response to yellow fever vaccine and a combined vaccine against measles, mumps and rubella. *Vaccine* 29:6327-6334.

Estudo realizado em Brasília, Distrito Federal, em 2006.

Instituições envolvidas: Escola Nacional de Saúde Pública/Fiocruz; Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo, IOC; Programa de Imunizações da Secretaria Distrital de Saúde, Brasília; Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Aprovado pela Comissão de Ética da Escola Nacional de Saúde Pública/Fiocruz, e pela Comissão de Ética do Distrito Federal.

Registro internacional.

Financiamento: PNI/MS; Fiocruz; CNPq; Secretarias de Saúde estaduais e locais.

Comentários. Vimos em 5.1.10. o trabalho de Stefano et al. mostrando que crianças de 9 meses de idade vacinadas contra sarampo no mesmo dia ou com intervalos variáveis não mostravam interferência da vacina de sarampo na resposta imune da vacina de febre amarela. Entretanto, a amostragem era pequena, o que impedia conclusões robustas, e a soroconversão global da vacina de febre amarela era de 77,5%, abaixo do esperado. Um estudo multicêntrico em crianças de 6-23 meses havia mostrado uma taxa de soroconversão e títulos médios geométricos (TMGs) significativamente mais baixos do que o de adultos com a mesma vacina. Os dados sugeriam que a administração simultânea das vacinas de sarampo e febre amarela aos 9 meses de idade, como era recomendado, diminuía a resposta imune da vacina de febre amarela (Grupo Colaborativo do Programa Nacional de Imunizações para o Estudo da Soroconversão pela Vacina Contra a Febre Amarela 2003). Além disso, não há dados publicados sobre as possíveis interações da vacina de febre amarela com as vacinas de rubéola e caxumba. Esse estudo comparou a imunogenicidade da vacina de febre amarela 17DD (produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz) com a vacina da Organização Mundial de Saúde, 17D-213/77. Foram incluídas no estudo 1828 crianças

de 12-23 meses de idade, saudáveis, das quais 906 receberam vacinação contra febre amarela e tríplice viral (SCR) simultaneamente e 922 vacinação SCR 30 dias antes da vacinação contra febre amarela. No momento do estudo duas vacinas SCR estavam sendo utilizadas na rede: a MMRI® MSD (sarampo: cepa Moraten; caxumba: cepa Jeryl Lynn; rubéola: cepa Wistar 27/3), e a vacina combinada contra rubéola, sarampo e caxumba™, Bio-Manguinhos/GSK (sarampo: cepa Schwarz; caxumba: cepa RIT 4385; rubéola: cepa Wistar 27/3. A vacina de febre amarela de Bio-Manguinhos foi produzida a partir do lote-semente 993FB013Z.

A proporção de soroconversão e a magnitude da resposta imune para rubéola foram maiores no grupo em que a vacina de febre amarela e a vacina tríplice viral foram administradas com intervalo de 30 dias, comparados aos que receberam essas vacinas simultaneamente ($p < 0,001$). Em contraste, os grupos definidos pelos tipos de vacina de febre amarela não mostraram diferenças significativas na resposta imune ($p > 0,5$).

As soroconversões e TMGs para sarampo foram semelhantes nos grupos que receberam as vacinas simultaneamente e separadamente, e diferentes vacinas de febre amarela.

As taxas de soroconversão para caxumba foram 61,1% no grupo com aplicação simultânea de vacina de febre amarela e tríplice viral, e 70,8% entre os que receberam as vacinas com 30 dias de intervalo ($p < 0,001$). TMGs e soroconversões foram semelhantes entre os grupos que receberam diferentes vacinas de febre amarela.

Para febre amarela, a proporção de soroconversão e a magnitude da resposta imune foram maiores no grupo vacinado com intervalo de 30 dias do que no grupo de aplicação simultânea ($p < 0,001$). Enquanto isso, as respostas foram semelhantes nos grupos definidos pelos diferentes tipos de vacina de febre amarela. As distribuições cumulativas reversas mostraram claramente a interferência entre as vacinas de febre amarela e rubéola, quando as mesmas são aplicadas simultaneamente. As respostas imunes foram as mesmas com a vacina de febre amarela com a cepa da OMS e a 17DD de Bio-Manguinhos.

Os eventos adversos foram os esperados para essas vacinas. A proporção de eventos adversos foi maior no grupo de administração simultânea, mas foi

estatisticamente significativa apenas para febre. Não houve diferença estatisticamente significativa na reatogenicidade das diferentes vacinas de febre amarela ($p>0,05$).

Esse estudo foi feito de acordo com todas as exigências éticas e regulamentares, inclusive registro internacional (ISRCTN). Agrega uma informação importante sobre menor imunogenicidade da vacina de febre amarela quando aplicada simultaneamente com a tríplice viral, e indicações de uma interação também negativa da vacina de febre amarela sobre a imunogenicidade dos componentes rubéola e caxumba da tríplice viral. O intervalo entre vacinação tríplice viral e coleta pós-vacinal de 30 dias ou 60 dias não foi o ideal para o componente caxumba, em que o melhor intervalo está mais próximo a 42 dias, mas esse fator (tempo entre vacinação e coleta), analisado por meio de regressões, não se mostrou relevante.

5.1.16. Martins RM, Maia MLS, Farias RHG, Camacho LAB, Freire MS, Galler R, Yamamura AMY, Almeida LFC, Lima SMB, Nogueira RMR, Sá GRS, Hokama DA, Carvalho R, Freire RAV, Pereira Filho E, Leal MLF, Homma A 2013b. 17DD yellow fever vaccine. A double blind, randomized clinical trial of immunogenicity and safety on a dose-response study. *Hum Vaccin Immunother* 9:1-10.

Instituições envolvidas: Bio-Manguinhos/Fiocruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz e Instituto de Biologia do Exército.

Aprovado pela Comissão de Ética do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

Financiamento: Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Comentários. Vimos anteriormente, no estudo de Lopes et al. 1988, que doses de vacina de febre amarela a partir de 1.000 PFU são mais do que suficientes para conferir imunidade adequada (5.1.9). Entretanto, a amostragem desse estudo incluía 12 a 48 participantes por grupo de diluição, insuficiente para se tirar conclusões robustas. Além disso, a metodologia utilizada era diferente da atual. Estudos realizados no Brasil anteriores ao de Lopes et al., referiam-se a cepas que não são mais utilizadas (Smith et al. 1938; Fox et al 1943). Estudos realizados fora do Brasil tinham também pequenas amostragens e resultados às vezes contraditórios (Smith et al. 1962; Freestone et al. 1977). Em 2008, devido à expansão da área de circulação do vírus da febre amarela no Brasil, houve uma escassez da vacina, e Bio-Manguinhos foi obrigado a interromper o fornecimento da vacina para outros países. Atualmente, há uma escassez dessa vacina em nível internacional, uma vez que ela é fornecida a agências internacionais apenas por três produtores, Bio-Manguinhos, Sanofi Pasteur e Instituto Pasteur de Dakar. A utilização da vacina em doses menores permitiria maior disponibilidade da vacina sem necessidade de aumentar a produção. Por essas razões, o Ministério da Saúde solicitou a realização de um estudo de dose-resposta com amostragem e metodologia adequada. O estudo foi realizado no Rio de Janeiro, em unidades militares. Seu objetivo era estudar a resposta imune e eventos adversos à vacina na sua dose habitual e em doses menores. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas e

teve registro internacional (ISRCTN 38082350). Os participantes, adultos jovens e saudáveis, foram alocados de maneira cega e foram estabelecidos 6 grupos, de 150 participantes cada um, com doses desde 27.476 UI (dose habitual) até 31 UI. A idade média foi de 19,4 anos, todos eram do sexo masculino e saudáveis.

Doses iguais ou acima de 587 UI tiveram imunogenicidade similar. A viremia por isolamento viral foi mais frequente no grupo soronegativo para dengue antes da vacinação do que nos soropositivos para dengue, e por qRT-PCR, a viremia persistiu por várias semanas após a vacinação, observações inéditas. Os eventos adversos foram similares entre os diversos grupos, com exceção de dor local, mais frequente no grupo de maior dose. Portanto, em caso de necessidade, a vacina de febre amarela pode ser utilizada em dose menor do que a habitual, pelo menos em adultos. Como os estudos realizados no Brasil têm apontado para menor imunogenicidade da vacina de febre amarela em crianças, um estudo similar precisa ser feito na idade da dose inicial da vacina de febre amarela em áreas endêmicas (nove meses de idade).

O estudo em epígrafe, bem como revisão cuidadosa de literatura, mostram que a idéia de que doses menores de vacina podem, paradoxalmente, induzir níveis mais elevados de anticorpos do que doses maiores (Monath, 2013) não se sustenta. Os estudos em humanos que sugerem essa relação inversa são inconsistentes e com pequena amostragem (Smith et al. 1962, Freestone et al. 1977).

O estudo de dose-resposta em epígrafe é o maior e mais completo estudo já realizado sobre o assunto e é apresentado na íntegra na segunda parte dessa tese.

Figura 26. Grupo de pesquisadores e consultores na Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos/Fiocruz



Da esquerda para a direita: Maria das Graças Tavares Ribeiro, Maria de Lourdes S. Maia, Maria de Lourdes Leal, Cristina Lemos, Ellen Jessouroun, Gabriel Oselka, Ivna A. Silveira, Isabella Ballalai, Raulino Sabino Oliveira, Glayse Glayde Barbosa, Reinaldo de Menezes Martins, André R. Périssé, Gloria Regina Silva e Sá

Estudos imunológicos com a vacina de febre amarela

Começamos aqui a seqüência de estudos referentes à resposta imunológica inespecífica, e cujo objetivo primordial é prevenir os eventos graves e às vezes fatais à vacina de febre amarela. Para facilitar o entendimento, começamos com um pequeno glossário.

Pequeno glossário de termos imunológicos

A profusão de descobertas celulares, humorais e moleculares dos diversos elementos da resposta imune mostrou um universo de enorme complexidade, que trabalha de maneira concertada para manter a homeostase e responder a ameaças com o mínimo de dano para o hospedeiro (Kaufmann et al. 2011). Este pequeno glossário visa facilitar o entendimento dos estudos imunológicos seguintes. As definições são simplificadas e não se destinam aos que tenham conhecimentos imunológicos mais profundos.

Os termos “high” (ou “bright”) e “intermediate” (ou “dim”) em sobrescrito significam a intensidade da fluorescência na citometria de fluxo.

ADCC – Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity)

CCL2/MCP-1 – Receptor e proteína quimioatrativa para monócitos - “monocyte chemoattractant protein”

CCL5 (RANTES)- Citocina quimiotática

CCR2⁺- Receptor de proteína 1 (CCL2) quimioatrativa de monócitos, mediando a quimiotaxia de monócitos. Um dos 11 receptores de quimiocina. Foi identificado na superfície de monócitos, células T de memória ativadas, células B, basófilos. Sinonímia: CD192.

CCR3⁺- Receptor de quimiocinas tipo 3. Fixa várias quimiocinas, como eotaxin (CCL11), eotaxin-3 (CCL26), MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13), e RANTES (CCL5). Expresso em eosinófilos e basófilos, e também em células T_H1 e T_H2.

CCR5⁺ - Receptor de quimiocinas cujo ligante natural é RANTES (CCL5) e proteína inflamatória de macrófagos (MIP). CCR5 é expresso em células T, macrófagos, células dendríticas e microglia.

CD – “Cluster of differentiation” – método utilizado para denominar moléculas da superfície celular que são característica de uma linhagem celular ou estágio de diferenciação. São reconhecidas por grupos de anticorpos monoclonais (“clusters”). Cada tipo de célula recebe uma denominação de acordo com o CD, por exemplo, CD1, CD2, etc.

CD16⁺ - FCγRIIIA –Glicoproteína ancorada na membrana celular por GPI – glycosylphosphatidylinositol. É uma subunidade de baixa afinidade do receptor Fc, envolvido na fagocitose de antígeno complexado a anticorpo e citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC)

CD18⁺- Molécula de adesão e sinalização de leucócitos; receptor de complemento

CD19⁺ CD32⁺- Expressão de modulação dos linfócitos B

CD19⁺B- Linfócitos B imaturos

CD19⁺CD23⁺- Expressão de ativação dos linfócitos B

CD19⁺CD5⁻- Linfócitos B convencionais

CD19⁺CD5⁺- Linfócitos B de tipo B-1; resposta imune humoral mas sem memória

CD19⁺CD69⁺- Expressão de linfócitos B com moléculas de ativação precoce

CD21⁺ - Linfócitos B maduros

CD23⁺- Células B. Regulação da síntese de IgE, gatilho para liberação de TNF, IL-1, IL-6, e GM-CSF de monócitos

CD25⁺ - Células B ativadas, células T, monócitos, e várias outras células. Induz ativação de células T, células NK, células B, macrófagos.

CD28⁺- Molécula co-estimuladora; estimula a produção de IL-6, que gera fatores de fase aguda inflamatória, febre, e induz a diferenciação de células B para produção de IgG.

CD3⁺T- Linfócitos T; expressão de receptores de células T (TCR)

CD32⁺ - FCγRII – Expresso por monócitos, macrófagos, neutrófilos e outras células. É um receptor de Fc dos complexos antígeno-IgG; regula a função de células B; induz fagocitose e explosão oxidativa em neutrófilos e monócitos; ação inibitória relevante de respostas celulares para evitar doença auto-imune.

CD38⁺ - ecto-enzima transmembrana de ativação

CD3⁺CD16⁺ - Células NK (“natural killer”)

CD4⁺CD45RO⁺T - Células de memória CD4⁺

CD4⁺CD25^{high+} – Células T regulatórias expressando CD25 com alta intensidade

CD4⁺HLA-DR⁺ - CD4 com molécula de ativação tardia

CD4⁺T - Indica resposta imune celular humoral, produção de anticorpos

CD5⁺ - Células T e células B maduras, estas de tipo B-1 B, células que secretam IgM de baixa afinidade, em contraste com células B-2 B, que com a participação de linfócitos T ajudam na geração de anticorpos de alta afinidade.

CD54⁺ - Molécula de adesão (ICAM-1) expressa em Linfócitos T e B e monócitos ativados

CD56⁺ - Células NK, *natural killer*

CD62L⁺ - Molécula de adesão, expressa em várias células (lectina)

CD64⁺-FCγRI - Proveniente de macrófagos, monócitos e PMN ativados por IFN-γ.

Endocitose de complexos antígeno-IgG; ADCC; apresentação de antígenos a células T

CD69⁺ - Molécula de ativação precoce; a ativação de linfócitos T e células *natural killer* induz a expressão de CD69. Esta molécula parece ser a glicoproteína de superfície induzida mais precocemente durante ativação de linfócitos, envolvendo células *natural killer* e plaquetas

CD8⁺CD38⁺T - Linfócitos T CD8 ativados; ecto-enzima transmembrana de ativação

CD8⁺CD45RO⁺T - Linfócitos de memória CD8⁺

CD8⁺HLA-DR⁺ - CD8 com molécula de ativação tardia

CD8⁺T - Indica resposta celular efetora (linfócito T citotóxico)

CXCL8/IL-8 - Fator quimiotático de neutrófilos, induz quimiotaxia de neutrófilos e fagocitose.

CXCR3+ - Receptor de quimiocinas CXCR3 é expresso primariamente em linfócitos T ativados e células NK. CXCR3 e CCR5 são expressos preferencialmente em células TH1, enquanto células TH2 favorecem expressão de CCR3 e CCR4

CXCR4⁺ - Receptor de quimiocinas com atividade quimiotática potente para linfócitos

Epitopo – ou determinante antigênico - É a área da molécula do antígeno que se liga aos receptores celulares e aos anticorpos

FCγ-R – Em monócitos, FC gamma Rs (I, II e III) são altamente expressos e funcionam no clearance de complexos imunes e patógenos opsonizados

HLA-DR - Antígeno leucocitário relacionado ao D; molécula de ativação tardia

HLA-DR, DP, DQ - Diferentes moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II)

IL-10 – Interleucina 10. Proveniente de subpopulações de células CD4⁺ e CD8⁺ ativadas. Estimula células B, estimula síntese de IgA, antagoniza síntese de células T_H1

IL-10R - Receptor de interleucina-10, mediando o sinal imunossupressivo da interleucina 10, e inibindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias.

IL-6 – Macrófagos e células endoteliais. Ação no fígado. Induz proteínas de fase aguda, estimula secreção de anticorpos pelas células B

ITC-Isotiocianato de fluoresceína (“fluoresceinisothiocyanate”)

NK – Células *natural killer* diferem por origem, fenotipicamente, e por função efetora, de células T *natural killer* (NKT). Em contraste a NKT, células NK não expressam receptores de antígenos de células T (TCR) ou CD3 Pan T ou receptor de imunoglobulinas de superfície (Ig), mas geralmente expressam os marcadores CD16 (FcγRIII) e CD56. Cerca de 80% das células NK expressam CD8

PAMP – Padrão molecular associado a patógenos (“Pathogen associated molecular pattern”).

PE- Ficoeritrina (“phycoerythrin”), corante fluorescente utilizado em citometria de fluxo

SSC^{high}CD16^{high+} - Neutrófilos

SSC^{intermediate} CD14^{high+} - Monócitos

TC - Tricolor (“tri-colour”), corante fluorescente utilizado em citometria de fluxo

TCR- receptor de células T

T_h0 – Célula T *helper* antes da diferenciação em T_H1 ou T_H2

T_H1 – Linfócito T auxiliar (*helper*) que produz citocinas direcionando a resposta imune para resposta citotóxica

T_H17 – Linfócito T auxiliar (*helper*) que produz citocinas direcionando a resposta imune para resposta humoral (anticorpos)

T_H2 – Linfócito T auxiliar (*helper*) que produz citocinas direcionando a resposta imune para resposta humoral (anticorpos) e resposta alérgica

TLR – Receptores celulares que se associam aos PAMPs e iniciam a resposta imune (“Toll-like receptors”)

TNF-alfa – Fator de necrose tumoral alfa. Macrófagos. Induz proteínas de fase aguda; ativação de neutrófilos; morte celular

Entre 1998 e 2000 expandiu-se a área de circulação dos vírus da febre amarela, e epizootias ocorreram de Roraima, ao Norte, aos Estados de São Paulo, Bahia, Minas Gerais e Mato Grosso. Além disso, o *Aedes aegypti* havia se disseminado por todo o país. Isso levou a uma expansão da vacinação contra febre amarela. Entre 1990 e 2000 cerca de 80 milhões de pessoas foram vacinadas contra febre amarela, das quais 34 milhões nos dois anos mais recentes. Em outubro de 1999 e fevereiro de 2000 dois casos fatais de doença viscerotrópica semelhante à febre amarela mas causados pela vacina foram confirmados (Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde 2000; Vasconcelos et al. 2001; Struchiner et al. 2004). Nessa mesma época, casos semelhantes foram descritos em outros países, com vacina de febre amarela de outros produtores, como revisado minuciosamente por Monath (2013). Além do mais, casos de meningoencefalite em adultos foram reconhecidos, primeiro nos Estados Unidos (McMahon et al. 2007) e depois no Brasil (Fernandes et al. 2007; Martins et al. 2010b).

Estudos minuciosos com os vírus vacinais implicados em doença viscerotrópica no Brasil mostraram que não houve mutações que pudessem explicar os eventos adversos (Galler et al. 2001). Além disso, vacinas dos mesmos lotes implicados nos eventos adversos foram aplicados em milhares de outras pessoas, sem eventos adversos relevantes. Por exemplo, 505.926 pessoas foram vacinadas em Goiânia com o lote 98UFB088Z, implicado no primeiro caso de doença viscerotrópica detectado no Brasil, e 855.697 pessoas foram vacinadas em Campinas e Americana com o lote 995FB029Z, implicado num caso fatal em Americana, São Paulo. Em análise retrospectiva, houve um caso mais antigo, de 1975, em que havia uma variante genética do vírus vacinal (Engel et al. 2006). Em outro estudo de quatro casos fatais, análise molecular dos vírus vacinais mostrou em um dos casos variações genéticas

(Martin et al. 2001). Não obstante, os pesquisadores, em geral, consideram que, mais provavelmente, são fatores individuais desconhecidos os responsáveis pelos eventos adversos graves.

Quatro casos de doença viscerotrópica foram associados a um único lote da vacina 17DD, no Peru. Comitê de Peritos organizado pelo Ministério da Saúde do Brasil e da OPAS analisaram todos os procedimentos, além das documentações de produção e controle de qualidade, e não encontraram nenhum problema de produção. Além disso, não foram identificadas mutações genéticas dos vírus recuperados dos casos (Whittembury 2009).

Imunodepressão não tem sido associada a eventos adversos graves à vacina de febre amarela. Doenças do timo têm sido associadas a maior risco de doença viscerotrópica, mas as doenças do timo estão associadas a auto-imunidade, e não a imunodepressão. Idosos, em alguns estudos, têm maior risco de doença viscerotrópica, mas no caso do Brasil isso não é claro.

Em um caso de doença viscerotrópica foi identificada uma anomalia genética associada a um possível distúrbio do eixo CCR5-RANTES, o que pode ter prejudicado a migração de células T efectoras e monócitos para os tecidos. A resposta imune específica de células T e B estava preservada (Pulendran et al. 2008). Em outro caso, pequenas alterações genéticas ligadas ao gene OAS (oligo-adenilase sintetase), que regula a ação do interferon, foram observadas (Belsher et al. 2007).

Em vários casos de doença viscerotrópica, inclusive nos dois acima citados, observou-se uma viremia elevada e prolongada, em contraste com a viremia baixa e de curta duração dos casos sem eventos adversos graves.

Em geral, deve-se reconhecer que a(s) causa(s) e os fatores de risco de doença viscerotrópica ou neurológica são desconhecidas (Thomas et al. 2012).

Uma possibilidade para explicar os eventos adversos graves é um padrão de resposta imunológica alterada. A imunidade específica humoral nos casos de doença viscerotrópica está mantida, pois nesses casos os anticorpos neutralizantes são encontrados em níveis elevados. Talvez haja uma deficiência seletiva de imunidade celular citotóxica, ou alguma deficiência nos mecanismos iniciais inespecíficos da resposta inata, questões pouco estudadas em relação à vacinação contra febre amarela.

5.1.17. Santos AP, Bertho AL, Dias DC, Santos JR, Marcovitz R 2005. Lymphocyte subset analyses in healthy adults vaccinated with yellow fever 17DD virus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100:331-337.

Instituições envolvidas: Laboratório de Tecnologia Imunológica, Bio-Manguinhos-Fiocruz, e Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Imunologia, IOC-Fiocruz.

Estudo aprovado pela Comissão de Ética da Fiocruz.

Financiamento: sem informações.

Comentários. Esse estudo explorou por citometria de fluxo a resposta imune celular após a vacinação contra febre amarela, em indivíduos basicamente normais. Dezesete pessoas saudáveis foram vacinadas com a vacina de febre amarela, produzida em Bio-Manguinhos. Oito eram primo-vacinados e nove estavam sendo revacinados, 10 anos ou mais após a primovacinação. A vacina 17DD mostrou-se muito eficaz, com ativação da resposta imune humoral e celular. Viremia não foi detectada, por nenhum dos métodos (RT-PCR ou plaqueamento). Não houve eventos adversos clínicos nem alterações relevantes nos hemogramas ou transaminases. Os primo-vacinados não tinham anticorpos contra febre amarela antes da vacinação e todos os que se revacinaram tinham anticorpos antes da revacinação, com título médio de 5.840 mUI/mL. Todos os primo-vacinados desenvolveram anticorpos, quatro dias após a vacinação em três de 8 participantes, e 15 dias após a vacinação em todos. Os revacinados responderam à revacinação com aumento de títulos, exceto num voluntário.

Citometria de fluxo mostrou aumento de CD3 (que indica resposta de células T), CD8 (que indica resposta celular efetora citotóxica) e CD4 (resposta imune celular com ativação humoral), mais precoce nos revacinados e mais tardia nos primo-vacinados.

Todos os tipos (subpopulações) de linfócitos pesquisados tinham percentuais aumentados em torno de 30 dias após a vacinação, comparados com os percentuais antes da vacinação, tanto de primo-vacinados quanto de revacinados.

Em primo-vacinados, as células T CD3⁺ aumentaram de 30,8% para 61,15%, e as células T CD4⁺ de 22,4% para 39,17%, com 43% dessas células correspondendo a células T CD4⁺ CD45RO⁺ (células de memória CD4⁺); células T CD8⁺ de 15,2% para 27%, com 70% correspondendo a CD8⁺CD45RO⁺ (células de memória CD8⁺).

Em revacinados, as células T CD3⁺ aumentaram de 50,7% para 80%, células T CD4⁺ de 24,9% para 40%, com 95% delas sendo células T CD45RO⁺, células T CD8⁺ de 19,7% para 25%, com 90% dessas células sendo células T CD8⁺ CD45RO⁺. Entre as células T CD8⁺ CD38⁺, que indicam células T ativadas, houve um aumento de 15% para 41,6% nos primo-vacinados e de 20,7% para 62,6% nos revacinados.

Esse estudo, embora pequeno, analisou com minúcia a resposta imune à vacina de febre amarela, mostrando que há uma ativação tanto do braço humoral quanto do braço celular, com indução de memória imunológica. Há evidências de memória de longo prazo (dez anos ou mais). A negatividade das viremias, após três coletas, contrasta com a elevada positividade encontrada em outros estudos, realizados há mais tempo, ou em outros centros. Mostramos em 5.1.16 que as viremias são menos freqüentes em pessoas soropositivas para dengue, o que talvez possa ser uma das explicações. Não foi feita no estudo em epígrafe sorologia para dengue.

5.1.18. Santos AP, Bertho AL, Martins RM, Marcovistz R 2007. The sample processing time interval as an influential factor in flow cytometry analysis of lymphocyte subsets. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102:117-120.

Instituições envolvidas: LATIM - Laboratório de Tecnologia Imunológica de Bio-Manguinhos/Fiocruz, e Laboratório de Imunoparasitologia, do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz.

O estudo se refere a voluntários, mas não explicita aprovação por Comissão de Ética.

Financiamento: sem informações.

Comentários. Eventos adversos graves após a vacina de febre amarela não têm fatores de risco identificados até agora, e são raros. Então, não é possível estabelecer um fluxo de coletas de amostras para análise imunológica que permita o seu processamento imediato. O objetivo desse estudo foi obter mais informações sobre a possível influência da demora de realização dos testes sobre os resultados das contagens de tipos (subpopulações) de linfócitos em participantes vacinados, bem como comparar dois métodos de imunofenotipagem, o de lise de sangue total e o de gradiente de sedimentação por Histopaque. Verificou-se que, com o método de lise de sangue integral, não houve alterações no percentual dos linfócitos T ou B com 24 e 48 horas, comparados com o tempo 0. Em contraste, quando as amostras de sangue foram processadas pelo método de gradiente de sedimentação por Histopaque, o tempo para processamento influenciou na percentagem de tipos de linfócitos T, embora não no de linfócitos B. Os resultados indicaram que o método de lise de sangue total é o de escolha para imunofenotipagem após eventos adversos graves, devido a menor variação dos níveis de tipos de linfócitos de acordo com o tempo de processamento.

5.1.19. Martins MA, Silva ML, Marciano APV, Peruhype-Magalhães V, Eloi-Santos SM, Ribeiro JGL, Correa-Oliveira R, Homma A, Kroon EG, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho AO 2007. Activation/Modulation of adaptive immunity emerges simultaneously after 17DD yellow fever first-time vaccination: is this the key to prevent severe adverse reactions following immunization? *Clin Exp Immunol* 148:90-100.

Instituições envolvidas: Laboratório de Doença de Chagas, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz; Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais; Departamento de Pós-Graduação em Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais; Departamento de Propedêutica Complementar, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais; Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais; Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz; Instituto Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz; Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais; Departamento de Análises Clínicas, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto.

Estudo aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Pesquisas René Rachou.

Financiamento: sem informações.

Comentários. Os estudos realizados com os vírus vacinais implicados nos casos de eventos adversos graves indicaram que as mutações acaso existentes não explicavam essas ocorrências. Por outro lado, a imunidade específica humoral estava preservada. Os estudos voltaram-se então a explorar a resposta imune inata, com foco no indivíduo. Porém, os mecanismos celulares e moleculares da resposta imune não-específica normal frente à vacina de febre amarela eram pouco conhecidos. Para investigá-los, foi realizado o estudo em epígrafe. Esse estudo faz uma análise minuciosa da resposta imune normal em 10 adultos primovacinados com a vacina 17DD, evidenciando uma resposta complexa, em que ativação e modulação parecem ocorrer simultaneamente. São limitações do estudo o pequeno número de

participantes e a não investigação de eventos que ocorrem antes de sete dias após a vacinação. Isso é relevante, pois na maioria dos casos de doença viscerotrópica a sintomatologia ocorre muito precocemente, em geral nos primeiros quatro dias, e às vezes já nas primeiras 48 horas após a vacinação. Então, é preciso estudar ainda mais precocemente a resposta imune após vacinação febre amarela. Penso também que é discutível a sugestão de que há cinética distinta de ativação de células T, com as células CD4⁺T ativadas mais precocemente e a ativação de células CD8⁺T representando um evento mais tardio após a vacinação 17DD.

Uma hipótese para a ocorrência de eventos viscerotrópicos é um desequilíbrio de regulação entre a resposta imune humoral e celular, ou entre os braços T_H1 e T_H2 da resposta imune, então as informações desse estudo, mostrando a sintonia fina desses eventos de ativação e modulação que ocorrem simultaneamente ou quase simultaneamente em condições normais, são importantes.

5.1.20. Santos AP, Matos DCS, Bertho AL, Mendonça SCF, Marcovistz R 2008.

Detection of T_H1/ T_H2 cytokine signatures in yellow fever 17DD first-time vaccinees through ELISpot assay. *Cytokine* 42:152-155.

Instituições envolvidas: LATIM - Laboratório de Tecnologia Imunológica de Bio-Manguinhos/Fiocruz, e pelo Laboratório de Imunoparasitologia, do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz. Estudo aprovado pela Comissão de Ética da Fiocruz.

Estudo realizado mediante termo de consentimento e de acordo com as normas do Comitê de Ética da Fiocruz.

Financiamento: sem informações.

Comentários. O grupo do LATIM continuou a estudar a resposta imune normal após a vacina de febre amarela. O estudo em epígrafe estudou as citocinas, por meio da técnica imunológica ELISpot, que permite o estudo de citocinas produzidas por células individuais. Doze pessoas saudáveis de 18 a 55 anos de idade foram vacinados pela primeira vez com a vacina de febre amarela 17DD. Os resultados são semelhantes aos anteriores, mostrando que, normalmente, após a vacina de febre amarela, há uma resposta imune balanceada celular (manifestada pelo aumento de IFN- γ) e humoral (IL-4), que as citocinas correspondentes já estão aumentadas no 7º dia após a vacinação, atingindo nível máximo no 15º dia após a vacinação. O estudo dos níveis de interferon gama tem implicações para as recomendações de aplicação da vacinas vivas injetáveis em relação temporal com a vacina de febre amarela. Neste estudo, os níveis são mais elevados após estimulação no 15º dia, mas no 30º dia, embora os níveis médios sejam similares aos pré-vacinais, alguns participantes ainda apresentam respostas com níveis elevados de interferon gama. Porém, esses achados *não* significam necessariamente que os níveis de interferon sejam elevados normalmente até 30 dias após a vacinação, na ausência de estimulação. Essa questão precisa ser melhor estudada, sabendo-se que o RNA vacinal pode persistir durante semanas na circulação (Martins et al. 2013) e ser excretado na urina durante longo tempo (Martinez et al. 2011), podendo teoricamente manter uma estimulação prolongada para produção de interferon.

5.1.21. Martins MA, Silva ML, Elói-Santos SM, Ribeiro JGL, Peruhype-Magalhães V, Marciano APV, Homma A, Kroon EG, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA 2008. Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination. *Vaccine* 26:1173-1184

Instituições envolvidas: Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais; Departamento de Biquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais; Departamento de Pós-Graduação em Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais; Departamento de Propedêutica Complementar, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais; Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais; Laboratório de Pesquisas Clínicas, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG; Instituto Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

Estudo aprovado pela Comissão de Ética do Centro de Pesquisas René Rachou.

Financiamento: Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, MG, e Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ.

Comentários. Esse estudo continua e expande as investigações do mesmo grupo sobre a resposta imunológica à vacina de febre amarela em pessoas normais. Em 5.1.20, foi investigada em primovacinados com a vacina 17DD a cinética da resposta imune fenotípica de subpopulações linfocitárias, verificando-se aumento simultâneo de eventos de ativação e modulação. No presente estudo, a investigação fenotípica se dirige para neutrófilos, eosinófilos, monócitos, células NK e NKT, isto é, para as respostas imunes inatas. Foram incluídos na investigação 10 participantes saudáveis (seis masculinos e 4 femininos) de 21 a 51 anos, sem história da vacinação anterior contra febre amarela, soronegativos por teste de neutralização para febre amarela. Os participantes foram vacinados com a vacina de febre amarela 17DD de

Bio-Manguinhos/Fiocruz. Esse estudo confirma e amplia os anteriores, mostrando que a resposta imune após a vacina de febre amarela tem um padrão misto, com ativação e modulação, e que a expressão de receptores de quimiocinas pelas células da imunidade inata, especialmente neutrófilos e monócitos, pode ter um papel crítico no estabelecimento de resposta imune ampla e não polarizada. Os autores lembram que CCR5 opera como um fator de defesa do hospedeiro contra infecções por *Flavivírus*. A deficiência de CCR5 está associada com aumento de risco de morte na infecção pelo vírus *West Nile*.

Pulendran et al. (2008) descreveram caso grave e não fatal de doença viscerotrópica (YEL-AVD) em paciente com polimorfismo genético no receptor de quimiocinas CCR5 e seu ligante RANTES, o que diminuiu a migração de células efectoras T e monócitos CD14⁺CD16^{bright} para os tecidos, com viremia prolongada (até 34 dias após a vacinação, por RT-PCR).

Belsher et al. (2007) descreveram caso fatal de doença viscerotrópica em que foram verificados polimorfismos nos genes OAS1 e OAS2 (3 alelos menores no gene OAS1 e AA-homozigozidade em OAS2 SNP rs 15895), que são essenciais na resposta imune às infecções virais. OAS1 e OAS2, induzidas pelo interferon, geram 2`5`oligoadenilato sintetase, a qual ativa RNase I, que por sua vez degrada o RNA viral e inibe a replicação viral.

Assim, há indicações na literatura de que distúrbios da resposta imune inata podem levar a doença viscerotrópica associada à vacina de febre amarela.

5.1.22. Neves PCC, Matos DCS, Marcovistz R, Galler R 2009. TLR expression and NK activation after human yellow fever vaccination. *Vaccine* 27:5543-5549

Instituições envolvidas: Laboratório de Tecnologia Imunológica de Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Aprovado pela Comissão de Ética da Fundação Oswaldo Cruz.

Financiamento: sem informações.

Comentários. Continua a busca pelo entendimento da resposta imune normal após a vacina de febre amarela, mantendo-se o foco na resposta imune inata, ou nas etapas iniciais da resposta imune, uma vez que a doença viscerotrópica associada à vacina de febre amarela (DV-VFA) ocorre nos primeiros dias após a vacinação, com evidências de uma replicação viral sem controle. Aqui, estudam-se os *Toll-like receptors* (TLRs) das células *natural killer* (NK). Os TLRs são receptores que atuam como sensores de padrões moleculares associados a agentes infecciosos patogênicos (PAMPs). A associação de PAMPs a TLRs induz respostas imunes e inflamatórias e aumenta a atividade citotóxica e liberação de citocinas pelas células NK. As células NK estimuladas pelos PAMPs e TLRs podem eliminar células infectadas por vírus, modular as respostas por meio das células dendríticas (DCs) e prover grandes quantidades de interferon-gama (IFN- γ), promovendo polarização para respostas imunes citotóxicas, T_H1. Uma anomalia desses receptores ou dos outros elementos envolvidos na resposta imune inata poderia comprometer a contenção viral nas etapas iniciais da infecção. Foram incluídos no estudo 8 participantes saudáveis (M = 5; F = 3), com idades de 19 a 39 anos (média 27 anos), sem história de vacinação prévia contra febre amarela, soronegativos para febre amarela. Todos foram vacinados com a vacina de febre amarela 17DD. Não foram relatados eventos adversos. Esse estudo, brilhantemente discutido, detalha os eventos da imunidade inata após a vacinação contra febre amarela, com destaque para a participação de células NK e TLRs. É concebível que qualquer distúrbio nesses mecanismos pode levar a uma replicação viral exagerada nas fases iniciais da resposta imune, e que a resposta adaptativa mais tardia pode ser incapaz de conter a replicação viral de forma adequada, isto é, preservando a vida e as

boas condições de saúde do hospedeiro humano. Também se pode conceber que uma resposta inata defeituosa pode levar a uma polarização inadequada da resposta adaptativa, por exemplo, em detrimento da resposta citotóxica. Ou ainda, pode haver um defeito na remoção de complexos imunes, levando a um efeito de *antibody enhancement*, ou respostas inflamatórias exageradas, como no dengue. São hipóteses que precisam ser estudadas nos casos de eventos adversos pós-vacinais.

No que se refere ao interferon gama, fica claro que níveis elevados podem persistir até os 15 dias após a vacinação, e nos dias 30 e 60 após a vacinação, embora as medianas não sejam estatisticamente significativas, há uma dispersão de dados, e alguns participantes persistem com níveis elevados, o que é relevante observação, visando ao aconselhamento do intervalo a ser seguido entre a vacina de febre amarela e outras vacinas vivas.

A persistência de níveis elevados de interferon gama em alguns participantes até 60 dias após a vacinação é intrigante, e seria interessante comparar essa curva de níveis de interferon com a de IgM. Isso indicaria replicação viral persistente num grupo de participantes?

5.1.23. Luiza-Silva M, Martins MA, Espírito-Santo LR, Campi-Azevedo AC, Silveira-Lemos D, Ribeiro JGL, Homma A, Kroon EG, Teixeira-Carvalho A, Eloi-Santos SM, Martins-Filho OA 2011. Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. *Vaccine* 29:583-592.

Instituições envolvidas: Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais; Centro de Pós-graduação, Curso Patologia – Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Minas Gerais; Departamento de Propedêutica Complementar, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG; Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB – Universidade Federal de Minas Gerais; Universidade Estadual de Montes Claros, Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro – Vila Mauricéia, Montes Claros, MG; Secretaria de Estado de Saúde do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG; Instituto Bio-Manguinhos – Fundação Oswaldo Cruz; Departamento de Microbiologia – ICB – Universidade Federal de Minas Gerais.

Estudo aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, MG.

Financiamento: Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, MG; Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ; apoio do PDTIS/Fiocruz, CNPq e FAPEMIG

Comentários. Os estudos anteriores do Grupo liderado pelo Centro de Pesquisas René Rachou haviam indicado que a resposta à vacina de febre amarela é complexa, com fenômenos de ativação/modulação e um perfil misto de citocinas, relacionadas à resposta imune inata. Aqui se ampliam os estudos para caracterizar a resposta à primovacinação contra febre amarela, incluindo a resposta de citocinas provenientes de leucócitos da imunidade adaptativa. Foi uma investigação longitudinal com quatro análises consecutivas de 10 participantes saudáveis de 21-51 anos nunca vacinados contra febre amarela, com sorologia por neutralização negativa para febre amarela. Os participantes foram vacinados, e não houve relatos de eventos adversos.

O estudo confirma os anteriores, sugerindo que há ativação/modulação em paralelo, com uma assinatura de citocinas mista após a vacinação contra febre amarela

em indivíduos normais. A contribuição desse estudo foi a possibilidade de identificar as fontes principais de citocinas pró e anti-inflamatórias, salientando o papel da imunidade inata ($\text{TNF-}\alpha^+$ de neutrófilos, $\text{TNF-}\alpha^+$ de monócitos e $\text{IFN-}\gamma^+$ de células NK, contrabalançadas por IL-10^+ de monócitos), assim como da imunidade adaptativa ($\text{IFN-}\gamma^+$ e $\text{TNF-}\alpha^+$ de células T CD4^+ e IL-12^+ de células T CD8^+ , moduladas por IL-5^+ de células T CD4^+ , IL-5^+ de células T CD8^+ e IL-10^+ de células B). Fica claro o padrão de ativação/modulação. É informação surpreendente a produção de interferon gama durante todo o período de observação, no dia 7 a partir de células NK, e nos dias 15 e 30 a partir de células T CD4^+ , em células estimuladas e não estimuladas *ex vivo* com vírus vacinal da febre amarela. Isso tem implicações para as recomendações sobre intervalo de vacinas.

No estudo, citado pelos autores, de Wheelock e Sibley (1965), a curva de interferon é precoce, se estende somente do dia 3 ao dia 8, logo após a curva da viremia. Esse estudo, entretanto, se limita os primeiros 12 dias após a vacinação (Figura 27).

Figura 27. Vírus circulantes, interferon e anticorpos inibidores da hemaglutinação após vacinação 17D em 15 participantes

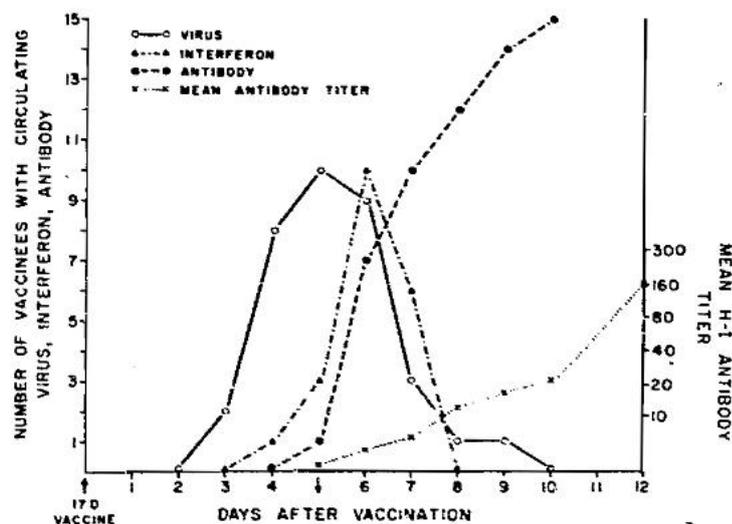


FIGURE 1. Circulating Virus, Interferon and Hemagglutination-Inhibiting Antibody after Vaccination with 17-D Virus in 15 Volunteers.

Fonte: Wheelock e Sibley (1965)

Além disso, o método de dosagem do interferon foi indireto, por meio da inibição da infecção pelo vírus Sindbis de uma cultura de células fetais humanas tratadas com o soro dos participantes.

Os dados indicando produção de IFN- γ durante os primeiros 30 dias após a vacinação com vacina de febre amarela do estudo em apreço coincidem com os achados dos estudos de Neves et al. (2009), revisado em 5.1.22, e de Santos et al. (2008), revisado em 5.1.20. A hipótese, então, é que a curva do IFN- γ seja bi-modal, o primeiro aumento acompanhando a viremia, a partir de células NK, e posteriormente, a partir de células T CD4+, para limitar a propagação da infecção viral intracelular, reforçando a ação das células T CD8⁺ citotóxicas.

5.1.24. Luiza-Silva M, Campi-Azevedo AC, Batista MA, Martins MA, Avelar RS, Lemos DS, Camacho LAB, Martins RM, Maia MLS, Farias RHG, Freire MS, Galler R, Homma A, Ribeiro JGL, Lemos JAC, Martins MA, Eloi-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA 2011. Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody. *J Infect Dis* 204:873-883.

Instituições envolvidas: Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais; Centro de Pós-graduação, Ciências da Saúde - Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG; Núcleo de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto – Morro do Cruzeiro, Ouro Preto, MG; Escola Nacional de Saúde Pública – Fiocruz, Rio de Janeiro; Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro; Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG; Hospital das Clínicas – HC, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP, Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto, SP. Departamento de Propedêutica Complementar, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

Estudo aprovado pela Comissão de Ética da Fundação Oswaldo Cruz.

Financiamento: Bio-Manguinhos/Fiocruz; CNPq; FAPEMIG.

Comentários. Os estudos imunológicos anteriores que procuraram relacionar a resposta de anticorpos neutralizantes com a mobilização de subpopulações de células linfocitárias (Santos et al. revisado em 5.1.17), ou com a expressão de citocinas (Luiza-Silva et al. revisado em 5.1.23) foram feitos em adultos. O estudo em apreço explora em crianças a resposta de citocinas e sua associação com a resposta imune específica de anticorpos neutralizadores. O objetivo do estudo foi avaliar as respostas imunes de crianças vacinadas aos nove meses de idade com a vacina de febre amarela 17DD, por meio de uma investigação detalhada do impacto de antígenos da febre amarela (vírus vacinais) no padrão de citocinas intracitoplasmáticas dos leucócitos periféricos inatos e adaptativos, caracterizando o perfil de citocinas envolvidas com o estado vacinal. Foram incluídas 60 crianças (34 sexo masc, 26 sexo fem) de 9 a 43 meses de idade.

PRNT foi realizado em amostra pré-vacinação e pós-vacinação, no Laboratório de Tecnologia Viroológica de Bio-Manguinhos, Fiocruz, e os resultados foram expressos em mUI/mL, com ponto de corte para soropositividade de $\geq 2,5 \text{ Log}_{10} \text{ mUI/mL}$.

Esse é um estudo complexo e difícil de interpretar. Trinta crianças soroconverteram e 10 não soroconverteram, com um ponto de corte relativamente baixo, $2,5 \text{ Log}_{10}$. O Grupo Colaborativo de Febre Amarela, num estudo multicêntrico, encontrou 88% de soroconversão em crianças de 12-23 meses e de 72% em crianças de 9-11 meses, quando a vacina monovalente de sarampo era aplicada aos 9 meses de idade. Em estudo mais recente, em crianças de 12-15 meses de idade, com ponto de corte de soropositividade de $2,7 \text{ Log}_{10}$, a soroconversão para febre amarela foi de 70%, quando a vacina de febre amarela foi aplicada simultaneamente com a tríplice viral sarampo/caxumba/rubéola, e de 87% quando essas vacinas foram aplicadas com intervalo de um mês (Silva et al. 2011, revisado em 5.1.15). Isso é muito menos do que o que se consegue em adultos, cerca de 98% de soroconversão (Camacho et al. 2004, revisado em 5.1.12). Interessante, o padrão de resposta imunológica foi diferente para os que soroconverteram e não soroconverteram na primovacinação, proinflamatório e regulador, respectivamente, mas esse padrão não se mantém na revacinação dos que não soroconverteram, que passam a adotar uma resposta proinflamatória.

5.1.25. Campi-Azevedo AC, Araujo-Porto LP, Luiza-Silva M, Batista MA, Martins MA, Sathler-Avelar R, Silveira-Lemos D, Camacho LAB, Martins RM, Maia MLS, Farias R H G, Freire MS, Galler R, Homma A, Ribeiro JGL, Lemos JAC, Auxiliadora-Martins M, Caldas IR, Elói-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho O 2012. 17DD and 17D-213/77 yellow fever substrains trigger a balanced cytokine profile in primary vaccinated children. *PLoS one* 7:1-11.

Instituições envolvidas: Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte, Minas Gerais; Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG; Escola Nacional de Saúde Pública – Fiocruz, Rio de Janeiro; Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro; Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG; Hospital das Clínicas – HC, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP, Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto, SP; Diretoria Regional de Brasília, Fiocruz, Brasília, Distrito Federal; Departamento de Propedêutica Complementar, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

Estudo aprovado pela Comissão de Ética do Centro de Pesquisas René Rachou. Registro internacional: ISRCTN72367932.

Financiamento: FAPEMIG; Bio-Manguinhos/Fiocruz; CNPq;

Comentários. O objetivo do estudo foi comparar a resposta imunológica em crianças a duas subcepas de vacina de febre amarela: 17DD, de Bio-Manguinhos/Fiocruz, e 17D-213/77, da Organização Mundial de Saúde. É o desdobramento de um grande estudo multicêntrico cujo protocolo foi explicado detalhadamente em publicações anteriores: Grupo Colaborativo do Programa Nacional de Imunizações para o Estudo da Soroconversão pela Vacina Contra a Febre Amarela (2007) e Silva et al. (2011). O presente estudo incluiu 80 crianças saudáveis dentre as 3.060 do estudo original, de 9 a 12 meses de idade.

Ambas as subcepas foram capazes de induzir eventos inflamatórios relevantes, quaisquer que fossem os níveis de anticorpos PRNT. Crianças que não soroconverteram do grupo 17DD apresentaram falhas na assinatura de citocinas

inflamatórias, especialmente nas células da imunidade inata, enquanto que no grupo da vacina 17D-213/77 a falha mais relevante foi a deficiência de produção de IL-12 pelas células T CD8⁺.

Revacinação com a vacina 17DD induziu uma resposta balanceada de citocinas no grupo que não havia soroconvertido da vacina 17DD, e uma resposta inflamatória robusta no grupo que não havia soroconvertido da vacina 17D-213/77. Em conclusão, os achados demonstraram que, do mesmo modo que a vacina de referência 17DD, a vacina 17D-213/77 induziu uma resposta mista inflamatória e regulatória. O estudo mostra que a vacina de referência da OMS tem um padrão de resposta imunológica semelhante à vacina 17DD de Bio-Manguinhos, embora com algumas diferenças no perfil e origem celular das citocinas.

5.1.26. Melo AB, Nascimento EJM, Braga-Neto U, Dhalia R, Silva AM, Oelke M, Schneck JP, Sidney J, Sette A, Montenegro SML, Marques E T 2013. T-cell memory responses elicited by yellow fever vaccine are targeted to overlapping epitopes containing multiple HLA-I and –II binding motifs. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7:1-11.

Instituições envolvidas: Laboratório de Virologia e Terapêutica Experimental, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fiocruz, Recife, Pernambuco; Centro de Pesquisas em Vacinas, Departamento de Doenças Infecciosas e Microbiologia, Universidade de Pittsburgh, Pennsylvania, EUA; Departamento de Engenharia Elétrica e Computação, Universidade A&M do Texas, College Station, Texas, EUA; Departamento de Patologia, Escola de Medicina da Universidade Johns Hopkins, Baltimore, Maryland, EUA; Instituto La Jolla de Alergia e Imunologia, Descoberta de Vacinas, La Jolla, California, EUA; Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fiocruz, Recife, Pernambuco.

Estudo aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, bem como pelos “Institutional Review Boards” das Universidades Johns Hopkins e de Pittsburgh.

Financiamento: National Institutes of Health (USA); Fundação Oswaldo Cruz; Conselho Nacional para Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq; Fundação Nacional de Saúde; Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Comentários. As respostas imunes à vacina de febre amarela foram analisadas quanto à imunogenicidade específica pelas dosagens de anticorpos, tendo como padrão ouro os anticorpos neutralizantes, que se correlacionam com a proteção contra a doença. Os eventos adversos graves após a vacinação contra a febre amarela, cujas manifestações clínicas são muito precoces, impulsionaram estudos imunológicos visando determinar aspectos da imunidade inata e não específica, bem como o perfil de resposta imunológica, inflamatória ou reguladora. Os estudos revisados anteriormente apontaram para uma resposta complexa, com um padrão misto, inflamatório e regulador.

Viu-se ainda que falha vacinal primária está associada a uma resposta reguladora, e que a revacinação dos não soroconversores leva à soroconversão, com uma mudança para um perfil de resposta imunológica predominantemente inflamatória.

O viscerotropismo induzido pela vacina de febre amarela em alguns indivíduos deve estar ligado a algum distúrbio da resposta imune inata, tendo em vista a precocidade de sua manifestação, e há vários estudos mostrando que em casos de viscerotropismo há grande produção de anticorpos neutralizantes. Além disso, os linfócitos T e B mostraram resposta antígeno-específica robusta, pelo menos em um caso de viscerotropismo, onde a viremia foi prolongada, o que indica que a persistência da viremia não se deveu a defeitos da imunidade adaptativa. Nesse mesmo caso, observaram-se polimorfismos genéticos heterozigóticos no receptor de quimiocinas CCR5 e seu ligante RANTES, que influenciam a migração de células T efetoras e monócitos para os tecidos (Pulendran et al. 2008).

A causa, ou as causas dos eventos adversos graves continuam obscuros, embora com alguns lampejos. Na ausência de marcadores biológicos que permitam antecipar sua ocorrência, ou de fatores de risco bem estabelecidos, as possibilidades de prevenção são limitadas a poucas situações de contra-indicações gerais para o uso de vacinas vivas.

A precocidade de acometimento e a sua gravidade tornam as possibilidades terapêuticas limitadas às medidas gerais de manutenção da vida. A disseminação viral descontrolada e precoce faz com que o uso de interferon seja pouco promissor. A oportunidade de uso do interferon seria antes da disseminação viral, o que na prática parece impossível. Entretanto, deve-se continuar buscando drogas antivirais para utilização nesses casos.

Uma das possibilidades para a solução do problema dos eventos adversos é a obtenção de uma vacina inativada, ou construída geneticamente com os epitopos responsáveis pela resposta imune específica.

O estudo em apreço estende as observações sobre a resposta imune específica mediada por células T à vacina de febre amarela, procurando identificar os epitopos responsáveis por essa resposta.

Foram incluídos 220 participantes, soronegativos por Elisa para febre amarela, vacinados com a vacina 17DD, no aeroporto de Recife. Foram identificados 16 antígenos imunodominantes que induziram a ativação de células T de memória circulantes, em 10% a 33% dos indivíduos. Ensaios bioquímicos de fixação *in vitro*, bem como estudos imunogenéticos e de imunogenicidade, indicaram que cada um dos 16 peptídeos continham 2 ou mais epitopos superponíveis e que podiam fixar-se com alta afinidade a moléculas de diversos HLAs.

A prevalência da imunogenicidade de um peptídeo na coorte estava correlacionada com a diversidade de alelos de HLA-II que eles podiam fixar. Esses achados sugerem que a superposição de *motifs* de fixação ao HLA dentro de um peptídeo aumenta sua imunogenicidade e a prevalência de resposta imune na população. Em conclusão, os resultados sugerem que, além de fatores ligados à imunidade inata, antígenos de células T “promíscuos” (isto é, que se ligam a diferentes alelos de HLA) podem contribuir para a alta eficácia da vacina de febre amarela. Os autores sugerem que antígenos de células T promíscuos podem ser melhores imunógenos, o que tem implicações para o desenvolvimento de vacinas. Os resultados indicam que o nível de promiscuidade das fixações de classe II estavam correlacionadas com a prevalência da imunogenicidade do peptídeo na coorte vacinada contra febre amarela.

Esse é um estudo sofisticado, que abre perspectivas para a identificação de peptídeos que podem ser usados como imunógenos em novas vacinas. A parceria de um grupo da Fiocruz de Pernambuco com grupos de pesquisa avançados dos Estados Unidos é extremamente louvável, e precisa ser estimulada.

5.1.27. Comentários finais sobre os estudos com a vacina de febre amarela

Os estudos clínicos com a vacina de febre amarela realizados no Brasil culminam uma longa pesquisa iniciada com o isolamento do vírus da febre amarela, o vírus Asibi, em 1927, em Accra, Gana, e Stokes, Bauer e Hudson conseguiram transmitir a febre amarela a macacos, percebendo-se que os mais suscetíveis eram macacos asiáticos, o *Macacus rhesus* e o *Macacus sinicus* (Stokes et al. 1928). Foi demonstrado claramente que se tratava de um vírus. Logo após, foi isolada outra cepa do vírus, em Dakar, Senegal, de um paciente sírio chamado François Mayali, o qual foi igualmente inoculado em macacos *Rhesus*, por Sellards e Laigret. Esses dois vírus deram origem às vacinas 17D (e sua variante 17DD) e francesa, respectivamente.

Max Theiler descobriu que o camundongo branco era suscetível ao vírus, conseguindo assim um animal mais adequado para estudos experimentais (Theiler 1930a, Theiler 1930b). Os vírus da cepa francesa foram passados em cérebros de camundongos, perdendo o seu viscerotropismo, mas tornaram-se demasiadamente neurotrópicos. Não obstante, essa vacina foi utilizada amplamente na África, era muito eficaz, e foi produzida até 1982.

Theiler, reconhecendo o neurotropismo da cepa francesa, passou para o Instituto Rockefeller, onde se dedicou a obter uma vacina menos neurotrópica. Isso foi conseguido com a passagem do vírus Asibi em embriões de camundongos e em embriões de galinha.

Depois desses estudos pacientemente desenvolvidos em animais, os estudos clínicos com a vacina da linhagem Asibi foram realizados no Brasil, a partir de 1935. Era ainda um vírus bastante neurotrópico, por isso foi usada uma mistura da vacina com soro imune ou hiperimune de convalescentes, macacos *rhesus* e cabras, que causaram reações alérgicas, e icterícia de longo período de incubação.

Posteriormente, pela passagem dos vírus em embriões de galinha dos quais o tecido nervoso foi removido, realizada por Theiler, houve grande diminuição do neurotropismo, sem reversão ao viscerotropismo. Assim, inicia-se a linhagem 17D.

Os pesquisadores que desenvolveram a vacina de febre amarela tinham convicção clara de que o ambiente (meio de cultura) tem importância na determinação

das propriedades de um vírus, seguindo a mesma linha de raciocínio de Pasteur (Lloyd et al. 1936). Essa idéia, reforçada recentemente pelos estudos de epigenética, indica que os estudos que conduziram à vacina de febre amarela seguiram uma linha lógica e que se desenvolveu progressivamente, num processo de acerto e erro, portanto empírico, mas de base racional.

Os estudos clínicos seguintes foram decisivos para aperfeiçoar a vacina. O primeiro deles, de Smith, Penna e Paoliello (1938, revisado em 5.1.2.) é um clássico da vacinologia. Embora ainda não houvesse Comissões de Ética, nem Agências Reguladoras, chama a atenção a maneira cuidadosa, progressiva, de realização dos estudos, com meticoloso registro de cada etapa. Primeiro a vacina foi aplicada em pequenos grupos, e a sua aplicação foi ampliada paulatinamente, começando em adultos e diminuindo progressivamente a idade dos participantes.

Nos estudos seguintes houve problemas de transmissão de hepatite pela vacina, encefalite, pela utilização de uma cepa neurotrópica, a NY-104; e imunogenicidade diminuída, pela utilização de vacinas provenientes de diversos níveis de passagens em ovos.

O problema da hepatite foi resolvido por Henrique Penna, ao mudar a maneira de coletar o embrião sem contaminá-lo, dessa maneira dispensando a adição de soro humano.

Para os demais problemas foi novamente Henrique Penna quem deu a contribuição maior e mais criativa, estabelecendo o sistema de lote-semente, a partir de um lote seguro, da subcepa 17DD. Penso que esse cientista, que também tinha sido o primeiro a identificar a leishmaniose visceral em laboratório no Brasil (Penna 1934), ainda não teve o devido reconhecimento pela comunidade científica do Brasil.

Nos estudos de eventos adversos, há lições a aprender. Uma das mais importantes, é que só se encontra o que se busca. Nos surtos de icterícia e meningoencefalite as incidências foram diferentes para o mesmo lote (icterícia), ou para lotes produzidos a partir do mesmo lote-semente (meningoencefalite), dependendo da localidade. Isso deixou os pesquisadores confusos, mas finalmente foi possível esclarecer a etiologia desses eventos adversos: soro humano utilizado no preparo da vacina (icterícia) e lote-semente com cepa neurovirulenta (meningoencefalite). Até hoje a ocorrência de eventos adversos graves após vacina de

febre amarela mostra frequência muito variável, e um dos fatores mais relevantes deve ser a qualidade e intensidade da vigilância epidemiológica.

Os estudos de duração da imunidade, inclusive até Groot (1962), foram feitos após vacinação com cepas que já não são utilizadas. Os estudos de duração da imunidade realizados mais recentemente, por Freire (2002), e Melo (2011), são relativamente pequenos, e o conhecimento mais exato sobre duração da imunidade após vacinação contra febre amarela é uma necessidade, especialmente após a vacinação em crianças.

Os estudos realizados no Brasil em crianças (Fox & Cabral 1943; Fox et al. 1943; Collaborative Group 2007; Silva et al. 2011) apontam para uma menor imunogenicidade nessa faixa etária, com possíveis implicações para a duração da imunidade, mas há necessidade de mais estudos sobre esse assunto.

Uma grande dificuldade na interpretação e comparação dos resultados são as diferentes metodologias utilizadas. É preciso haver uma uniformização de procedimentos e dos critérios de interpretação de imunidade, para que se possa avançar nesses conhecimentos de forma segura.

Como mostraram Lopes et al. (1988b), em seu estudo de dose-resposta, e também por Martins et al. (2013), em adultos a dose da vacina pode ser utilizada numa dose muito menor do que a atual. Isso teria a vantagem de viabilizar o aumento na disponibilidade da vacina, e além disso, pode ser que uma dose menor diminua o risco de eventos adversos graves.

Desde 1999, foram relatados 65 casos de doença viscerotrópica, uma disseminação visceral do vírus vacinal da febre amarela, com alta letalidade. A causa desse evento adverso grave ainda não está estabelecida. Admite-se que se trata de uma vulnerabilidade de natureza individual, do hospedeiro, pois não foram identificadas mutações do vírus que pudessem justificar esses casos. Alguns fatores de risco identificados são idade acima de 60 anos e timectomia, mas na maioria dos casos não foram identificados fatores de risco. Parece que mulheres jovens e pessoas com doenças auto-imunes, como lúpus eritematoso sistêmico, também têm maior risco de doença viscerotrópica após a vacina de febre amarela.

O estudo imunológico de pacientes com eventos graves após a vacina de febre amarela raramente explorou os aspectos da imunidade inata.

Belsher et al. (2007) detectaram em um caso fatal de doença viscerotrópica níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, mas sem anormalidade que pudesse explicar o evento. Foi observada a presença de 3 alelos menores no gene OAS1 e homozigose em OAS2 SNPrs15895, que poderia levar a um truncamento da proteína OAS2, com prejuízo na atividade antiviral mediada por OAS (oligoadenilato sintetase).

Pulendran et al. (2008) observaram polimorfismos genéticos no receptor de quimiocinas CCR5 e seu ligante RANTES, que regula quimiotaxia de células T efectoras e monócitos para os tecidos. Doblas et al. (2006) observaram níveis elevados de GRO, GRO- α , IL-6, IL-8, IL-10, e MCP-1, com sinais fracos de GCSF, GM-CSF, IL-1 α , IL-13, MIG e TGF- β 1, sugerindo estimulação dos compartimentos humoral e celular da resposta imune. Sequenciamento viral nos casos de Belsher e Pulendran não mostrou mutações que explicassem os eventos adversos, foram encontradas apenas mutações silenciosas.

Galler et al. (2001) estudaram os vírus vacinais de dois casos fatais de doença viscerotrópica após vacina de febre amarela 17DD. O seqüenciamento dos nucleotídeos dos vírus evidenciou variações pequenas em algumas posições dos nucleotídeos, em comparação com os vírus do lote semente, não consistentes entre os isolamentos, e que não resultavam em substituições de aminoácidos. Inoculação de macacos rhesus com os vírus isolados dos pacientes por via intracerebral e intrahepática causaram mínima viremia e alterações histológicas de acordo com o esperado para vírus vacinais.

Silva et al. (2010) observaram uma expressão diminuída de Fc- γ R nos monócitos de um caso suspeito de doença neurotrópica, associado a pancreatite e miosite, em uma paciente com lúpus eritematoso sistêmico. Em relação a fatores de risco, avaliados epidemiologicamente, não há informações consistentes. Aumento de risco em pessoa mais idosas foi encontrado em alguns estudos, mas não em outros. Timectomia é considerado um fator de risco.

Seligman (2011) observou um maior risco para mulheres de 19-34 anos, sem imunodeficiências. Parece que há um risco por idade bi-modal, diferentes de acordo com o sexo. Thomas (2012) numa extensa revisão não conseguiu obter dados confiáveis que permitissem estabelecer fatores de risco.

As evidências apontam para alguma anomalia genética e/ou da imunidade inata das pessoas com os eventos adversos graves, mas por enquanto as escassas informações não permitem conclusões, apenas algumas sugestões de anomalias genéticas, imunológicas e fatores de risco.

O abandono da vacina francesa, a adoção do sistema de lote-semente a partir de lotes seguros, e o limite mínimo de seis meses de idade para vacinação contra febre amarela pareciam ter resolvido o problema do neurotropismo. Entretanto, McMahon et al. (2007) relataram 15 casos de doença neurológica após a vacina de febre amarela, na maioria dos casos meningoencefalite. O vírus da febre amarela não foi isolado do líquido, e o diagnóstico de meningoencefalite foi feito pela exclusão de outras etiologias e positividade da IgM para febre amarela no líquido.

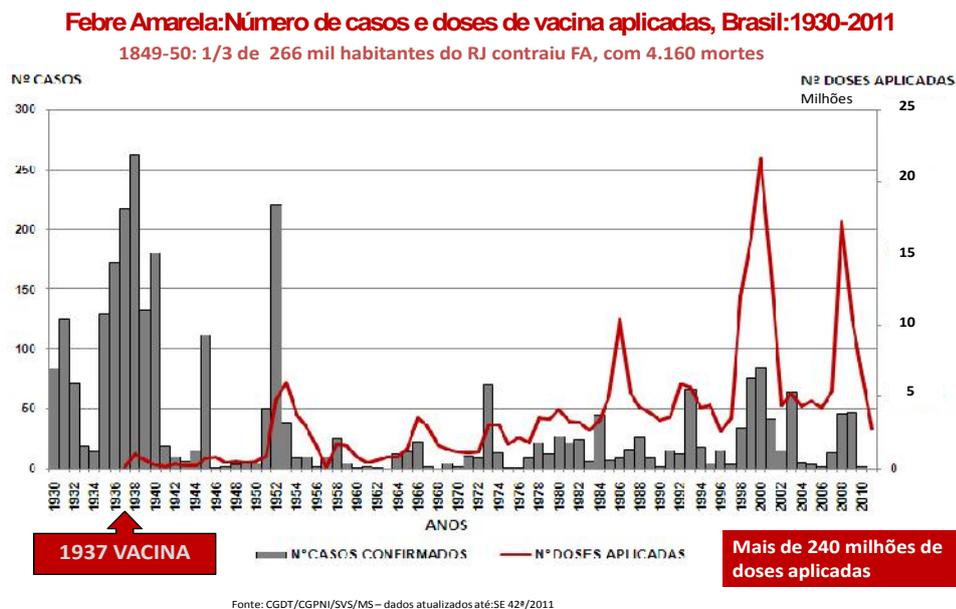
Isso alertou o nosso sistema de vigilância de eventos adversos, do Ministério da Saúde, e numa campanha no Rio Grande do Sul foram identificados 35 casos de meningite asséptica, associados temporalmente e causalmente à vacina de febre amarela (Martins et al. 2010b). Outros autores também relataram eventos adversos neurológicos após a vacinação contra febre amarela. Portanto, a vacina contra febre amarela tem uma neurovirulência residual, e embora os casos de meningite asséptica tenham em geral bom prognóstico, essa é uma nova preocupação quando se avaliam as opções de vacinar ou não contra febre amarela.

Os eventos adversos graves ensejaram uma série de estudos, realizados pelo Laboratório de Tecnologia Imunológica de Bio-Manguinhos/Fiocruz, e pelo Instituto René Rachou, da Fiocruz MG, visando um melhor conhecimento da resposta imune normal após a vacina de febre amarela, o que permita talvez um reconhecimento de seus desvios durante a ocorrência dos eventos adversos, e um melhor entendimento de sua fisiopatologia. Esses estudos são notáveis, e colocam o Brasil na vanguarda, nessa área.

Os poucos estudos imunológicos realizados em pacientes com eventos adversos graves apontam para falhas na imunidade inata. Tivemos participação no estudo de um desses casos (Silva et al. 2010), que mostrou uma reduzida expressão de Fc- γ R e produção baixa de citocinas nos monócitos. Pulendran et al. (2008) também observaram uma possível anomalia na migração de monócitos e células T efetoras para os tecidos.

No momento em que escrevo essas linhas estamos tentando restabelecer a parceria com a Universidade Rockefeller, em New York (antigo Instituto Rockefeller), visando encontrar, em pacientes com eventos adversos, ou seus familiares próximos, um marcador genético que nos permita identificar as pessoas em risco de eventos adversos graves após a vacinação contra febre amarela. Entretanto, tudo considerado, a vacina de febre amarela tem sido de valor inestimável. Sem ela a vida civilizada em regiões tropicais seria quase inviável. Com a aplicação da vacina, desde 1937, a doença tem se mantido sob controle, embora persistam casos, quase todos em não vacinados, trabalhadores rurais de áreas endêmicas ou turistas que a elas se destinam. As falhas vacinais (casos em vacinados) têm sido muito raras. A última epidemia de febre amarela urbana de grande porte no Brasil ocorreu em 1928, no Rio de Janeiro, e foi controlada pelo Departamento Nacional de Saúde Pública, tendo à frente Clementino Fraga, com a colaboração da Fundação Rockefeller, através de medidas de combate aos focos de mosquitos. O último caso de febre amarela urbana no Brasil ocorreu em Sena Madureira, no Acre, em 1942. Para o Brasil, essa é uma conquista da saúde pública tão importante quanto a erradicação da varíola.

Figura 28. Número de casos de febre amarela e doses de vacinas aplicadas, Brasil, 1930-2011(*)



(*) As colunas representam número de casos, e a linha representa o número de doses de vacinas aplicadas.

5.2. Estudos clínicos com a vacina de sarampo.

5.2.1. Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Bermudez JAZ, Pinhão AT, Queiroz B, Venâncio LR, Assis CER, Shiraiwa T 1982. Serological response to measles vaccine (Schwarz strain) in a low-income population at Rio de Janeiro. *Rev Microbiol São Paulo* 13 (3):242-243.

Instituições envolvidas: ENSP/Fiocruz

Sem informação sobre Comissão de Ética.

Financiamento. Sem informação.

Comentários. Foram estudadas 403 crianças de sete a 25 meses de idade que moravam numa comunidade de baixo nível sócio econômico perto do campus da Fundação Oswaldo Cruz e que freqüentavam a unidade de saúde da Escola Nacional de Saúde Pública. Foi aplicada a vacina de sarampo Schwarz do Instituto Merieux e coletado sangue antes e quatro a oito semanas após a vacinação. Foram dosados anticorpos inibidores da hemaglutinação. Os resultados mostraram uma soroconversão crescente à medida que a idade aumentava, sendo satisfatória (83%) a partir de nove meses de idade. Esse estudo respaldou a orientação de iniciar a vacinação contra o sarampo aos nove meses de idade, e indica que uma segunda dose seria necessária. Em situações de surto a vacinação poderia ser iniciada aos seis meses, mas a soroconversão nessa idade seria muito mais baixa. No estudo em apreço a soroconversão aos sete meses de idade foi de apenas 58%. A idade de início da vacinação contra sarampo, e a necessidade de revacinação, levando em consideração os dados epidemiológicos da doença e de soroconversão à vacina, foi uma controvérsia que se arrastou durante muitos anos. Essa controvérsia ressurgiu agora com o atual surto da doença em vários estados do Nordeste, atingindo inclusive crianças no primeiro ano de vida.

5.2.2. Oliva OP, Chaves JRS, Loureiro MLP, Pereira LA, Homma A 1986. Vacina CAM-70 contra o sarampo, produzida no Brasil. Avaliações de campo em crianças com 6 - 12 meses de idade. *Boletim Epidemiológico, Ministério da Saúde, Fundação SESP, ano XVIII nº 21/26, p. 121-129.*

Instituições envolvidas: Fiocruz , Fundação de Pesquisas para Doenças Bacterianas da Universidade de Osaka, Instituto de Pesquisas em Doenças Microbianas da Universidade de Osaka, Instituto Nacional de Saúde do Japão, Agência de Cooperação Internacional do Japão.

Sem informação sobre Comissão de Ética.

Financiamento: sem informações.

Comentários. A Investigação Interamericana de Mortalidade em Crianças, da Organização Pan-Americana da Saúde, havia mostrado, desde 1973, que o sarampo era uma causa indireta muito importante de mortalidade entre as crianças, agravando a desnutrição e causando pneumonias pelo próprio vírus do sarampo ou por complicações bacterianas. Essa investigação mostrou que em três cidades brasileiras (Recife, São Paulo e Ribeirão Preto) o sarampo constituiu a principal causa de óbito não apenas entre as doenças infecciosas, mas entre todas as causas, nas crianças de um a quatro anos de idade (Puffer & Serrano 1973a,b). Além disso, essa investigação mostrou que a mortalidade pelo sarampo era muito precoce na América Latina, 1/3 dos óbitos ocorriam durante o primeiro ano de vida. Por outro lado, a vacina de sarampo é menos eficaz no primeiro ano de vida, pela interferência da imunidade passiva de origem materna, prejudicando a imunização ativa.

Apesar da vacinação conduzida pelo governo brasileiro ter sido iniciada em fins da década de 60, foi somente em 1975 que a Lei Federal nº 6.259, de 30 de outubro de 1975, definiu as vacinações de caráter obrigatório e as doenças de notificação compulsória, incluindo entre estas o sarampo.

A vacina contra o sarampo era importada. Visando reduzir a dependência externa o governo brasileiro passou a apoiar decisivamente projetos voltados para o desenvolvimento e produção de produtos biológicos.

Na busca de uma parceria para a produção nacional da vacina contra o sarampo, após o fracasso de negociações com o Instituto Mérieux, na administração de Guilardo Martins Alves na Fiocruz, e estando Akira Homma à frente de Bio-Manguinhos, conseguiu-se estabelecer uma parceria com o Japão para atingir esse objetivo.

Desde 1979 Akira Homma vinha fazendo contato com Shunjo Chiba, virologista a quem ajudara nos Estados Unidos, durante o pós-doutorado em Houston, Texas, e por intermédio dele chegou a Konosuke Fukai, do Instituto de Pesquisas Microbianas da Universidade de Osaka, conhecido como Biken.

Por meio do Acordo de cooperação Brasil-Japão, celebrado no governo Geisel, a parceria com o Japão, visando transferência de tecnologia para produção da vacina de sarampo na Fiocruz, estendeu-se de 1980 a 1984. O governo japonês investiu cerca de 5 milhões de dólares, forneceu os equipamentos, e treinou cerca de 30 tecnólogos de Bio-Manguinhos.

Como afirmou Maria da Luz Fernandes Leal, atualmente Vice-Diretora de Qualidade de Bio-Manguinhos, os japoneses não venderam tecnologia, mas a doaram, junto com a cepa vacinal.

Segundo Akira Homma, atualmente Presidente do Conselho Político e Estratégico de Bio-Manguinhos, os brasileiros tiveram acesso a toda a tecnologia, de ponta a ponta. Ainda no âmbito dessa cooperação, houve a transferência de tecnologia da vacina de poliomielite, da qual falaremos adiante (Benchimol 2001c).

Assim, um laboratório de produção de vacina contra o sarampo foi instalado na Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, em 1980, mediante cooperação técnica e científica com a Fundação de Pesquisas da Universidade de Osaka (Fundação Biken), com o apoio da Agência de Cooperação Internacional do Japão (JICA). Participaram dessa pesquisa pesquisadores do Instituto Evandro Chagas, Fundação SESP, Pará; da Fundação SESP, Rio de Janeiro; do Kan-onji Institute, Japão; do Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japão.

No estudo em epígrafe, cinco lotes experimentais consecutivos de vacina contra o sarampo foram produzidos com sucesso e aprovados por controle de qualidade em 1982. O lote semente primário da vacina CAM-70/FIOCRUZ foi doado pela Fundação BIKEN, de Osaka, Japão. A vacina, liofilizada, foi reconstituída

imediatamente antes da vacinação e 0,5 mL foi injetado por via SC no braço ou nádega. A vacina foi avaliada em crianças do interior dos Estados de Pernambuco e Pará. Foram vacinadas 341 crianças na faixa etária de 6 a 12 meses, sem história prévia de sarampo. A avaliação sorológica foi realizada pela determinação dos títulos de anticorpos de inibição da hemaglutinação (HI) e de neutralização (NT). As amostras foram coletadas antes e um mês após a vacinação. Apenas soros pareados foram analisados em relação à resposta de anticorpos. Os pontos de corte para soropositividade foram $\geq 1:4$ em anticorpos NT e $\geq 1:5$, em títulos de anticorpos IH. Foram calculadas as médias geométricas dos títulos para o teste de neutralização e a média aritmética para os títulos IH. Dentre 341 crianças vacinadas, foram obtidas 333 (97,7%) amostras de soros pareados, dos quais 245 (73,6%) não apresentavam anticorpos neutralizantes antes da vacinação.

O percentual de crianças com anticorpos positivos antes da vacinação foi maior nas crianças com menor idade, como esperado, devido à passagem de anticorpos maternos através da placenta. Crianças com baixos títulos de anticorpos neutralizantes antes da vacinação tiveram aumento dos títulos com a vacinação. As que tinham títulos de anticorpos NT antes da vacinação de $2^{1,5}$ (2,8) mostraram soroconversão de 47%, e as com títulos maiores do que este não tiveram aumento de anticorpos NT.

Os resultados foram semelhantes aos observados no Japão com a mesma vacina.

Os autores sugerem que, para superar o problema da menor imunogenicidade em crianças de menos de 1 ano, deveriam ser feitas duas doses, a primeira com menos de 1 ano, e a segunda com 15 meses ou mais de idade.

Salientam, entretanto, que a SC de 90% com 9 meses de idade poderia reduzir a taxa de mortalidade infantil em 1/20 do número então existente (em torno de 60 por mil nascidos vivos), justificando a política de vacinação contra o sarampo a partir de 9 meses de idade.

A produção nacional de vacina contra o sarampo foi uma etapa importante, criou as bases para a produção industrial em Bio-Manguinhos, abriu o caminho para outras transferências de tecnologia, e deu impulso à política de parcerias público-privadas. Não só ficava assegurado o fornecimento regular de vacinas para o PNI como

capacitou técnicos de Bio-Manguinhos para técnicas de culturas de tecidos e outros procedimentos tecnológicos avançados para a época.

Até 2003, cerca de 185 milhões de doses desta vacina foram entregues ao governo brasileiro, o que teve papel decisivo para o controle do sarampo no Brasil. Criou-se ainda uma base de recursos humanos que seria importante para sustentação das atividades de Bio-Manguinhos e incorporação de novas tecnologias.

Figura 29. Guillardo Martins Alves e Konosuke Fukai



5.2.3. Camacho LA, Freire MS, Yamamura AMY, Leal ML, Mann G 2000. Estudo de soroconversão com formulações da vacina Biken CAM-70 contra sarampo. *Rev Saúde Pública* 34:358-366.

Instituições envolvidas: Estudo realizado nas comunidades adjacentes ao campus da Fiocruz e que frequentavam o Centro de Saúde Escola Germano Sinval Farias da Escola Nacional de Saúde Pública da Fiocruz, entre janeiro de 1996 e fevereiro de 1997.

Financiamento: CNPq. Não faz referência a Comissão de Ética. A primeira Resolução do Conselho Nacional de Saúde criando as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos é de outubro de 1996, e esse estudo começou em janeiro deste ano.

Comentários. A vacina de sarampo da cepa CAM-70 foi licenciada no Brasil na dose de 5.000 CCID (dose infectante de cultura de células 50%), com base nos testes de campo conduzidos no Pará e Pernambuco e resumidos no item anterior. Naquele estudo, não foi utilizada na técnica de neutralização o soro referência internacional com unidades de proteção estabelecidas que permitisse a comparação com títulos obtidos em outros estudos. Além disso, nos testes de potência deve-se utilizar preparações de vírus-padrão. Em 1993, Bio-Manguinhos requisitou ao Instituto Biken preparações de vírus-referência para que pudesse ser preparado o vírus-padrão, que permitisse a calibração dos testes. A amostra de vírus-referência proveniente do Japão indicou a necessidade de uma diminuição nos títulos em aproximadamente dez vezes. Isto levou à realização de estudo para avaliar a possibilidade de redução da concentração de vírus na vacina. O objetivo do estudo foi avaliar se a concentração de partículas virais usada na formulação da vacina estava adequada ou se, por redução de sensibilidade nos testes de potência, devido à troca de semente de células usadas nos ensaios de potência, as vacinas estavam sendo formuladas com excesso de vírus. O estudo teve como objetivos avaliar e comparar as taxas de soroconversão obtidas com a vacina de sarampo Biken CAM-70 nas doses de 5.000, 1.000, e 200 CCID em crianças saudáveis de nove a 18 meses de idade sem história de vacinação contra sarampo ou de sarampo; comparar as médias de anticorpos induzidas pelas formulações vacinais; e

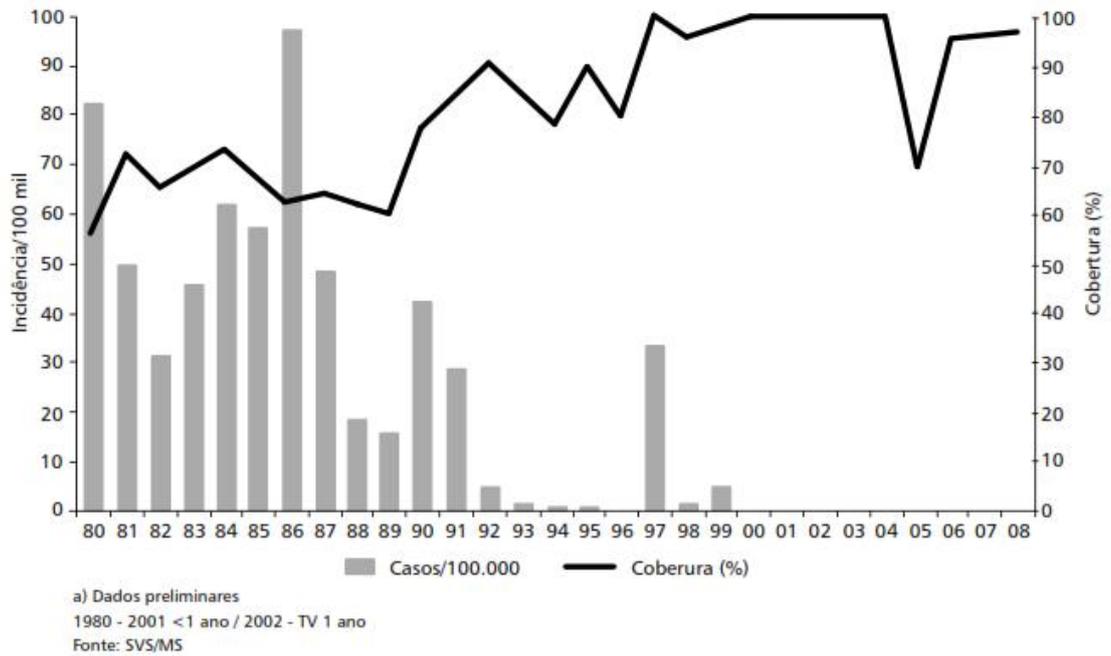
comparar a frequência de eventos adversos com as três formulações da vacina. Foi um estudo comparativo, randomizado, triplo-cego, em que o desfecho primário foi a resposta imunológica. A aplicação das vacinas e a coleta de sangue foram realizadas no Centro de Saúde Escola Germano Sinval Farias da Escola Nacional de Saúde Pública da Fiocruz. As dosagens de anticorpos neutralizantes e o monitoramento da potência das vacinas foram realizados em laboratórios de Bio-Manguinhos. As crianças cujos pais concordaram em participar do estudo foram distribuídas aleatoriamente pelos três grupos de comparação. O grupo de maior concentração (5.000 CCID₅₀) serviu de referência, pois se tratava da dose administrada na rotina.

Foram incluídas 223 crianças, das quais 187 (83,9%) completaram todos os procedimentos. As idades variaram de 8,6 a 23,5 meses, e 78,5% tinham menos de 10 meses. O percentual de crianças que não tinham anticorpos contra sarampo antes da vacinação era de 93%. Desnutridos leves e moderados eram 9,6%, 14,1% e 17,8% nos grupos de 200, 1.000 e 5.000 CCID₅₀ respectivamente.

As proporções de soroconversão e de soropositividade tiveram diferenças estatisticamente significativas diferentes entre os grupos, com valores maiores para o grupo de 5.000 CCID₅₀. O percentual de soroconversão foi de 37,1% no grupo de 200 CCID₅₀, 55,4% no grupo de 1.000 CCID₅₀, e 81,7% no grupo de 5.000 CCID₅₀. As médias geométricas foram de (mUI/mL) 118 (IC95% 71-198), 166 (IC95% 102-271) e 506 (IC95% 339-755). As diferenças se mantiveram após ajustamento para estado nutricional e outras variáveis. Os eventos adversos foram similares entre os diversos grupos.

Apesar dos autores considerarem que a soroconversão de 82% obtida no estudo não foi satisfatória, a soroconversão e os intervalos de confiança com a maior dose (82%; IC 95%: 70,7%; 89,4%) estão dentro do esperado para esse tipo de vacina nessa faixa etária, pois 78,5% das crianças tinham menos de 10 meses de idade. Os autores, entretanto, afirmam que a vacina Biken CAM-70 produzida em Bio-Manguinhos estava atendendo aos padrões de segurança e eficácia, permitindo uma redução drástica do número de casos de sarampo no Brasil entre 1992 e 1997, o que se pode ver na Figura 30.

Figura 30. Coeficiente de incidência e cobertura vacinal do sarampo. Brasil, 1980 a 2008 (*)



(*) As colunas representam a incidência de casos por 100.000 hab., e a linha a cobertura vacinal

5.2.4. Lindgren-Alves CR, Freire LMS, Oliveira RC, Guerra HL, Da-Silva EE, Siqueira MM, Horta IM, Queiroz CC 2001. Pesquisa de anticorpos contra o sarampo em crianças infectadas pelo HIV, após imunização básica. *Jornal de Pediatria* 77:496-502

Instituições envolvidas: Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais; Laboratório de Imunologia Molecular e Celular do Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, MG; Laboratório de Epidemiologia e Antropologia do Centro de Pesquisa René Rachou, Fiocruz, MG; Laboratório de Vírus Respiratórios da Fiocruz, RJ; Fundação Hospitalar de Minas Gerais. Período de estudo: 1995 e 1996.

O Termo de Consentimento e o protocolo de pesquisa foram aprovados pela Câmara do Departamento de Medicina da UFMG e Comitê Técnico-Científico do Hospital das Clínicas da UFMG.

Financiamento: Centro de Pesquisas René Rachou.

Comentários. A vacina contra o sarampo, sendo uma vacina viva, é contraindicada para pacientes imunodeprimidos, e assim não deve ser dada para pessoas infectadas pelo HIV com baixas contagens de linfócitos CD4⁺. Por outro lado, o sarampo é grave em pessoas HIV positivas. Então, é importante vacinar contra sarampo as crianças infectadas pelo HIV o mais precocemente possível, antes que se tornem imunodeprimidas. O presente estudo foi delineado para verificar a presença de anticorpos contra o sarampo em crianças com infecção perinatal pelo HIV e devidamente vacinadas, para ajudar a nortear a elaboração de rotina de imunizações adequada para crianças HIV positivas. É um estudo de coorte retrospectivo. Foram incluídas 50 crianças, das quais 21 com infecção perinatal pelo HIV. As crianças infectadas pelo HIV tinham mais de 15 meses de idade, com diagnóstico confirmado por *Western-Blot*. Os participantes deveriam ter recebido duas doses de vacina contra o sarampo, ou pelo menos uma dose após o primeiro ano de vida. Foi aplicado termo de consentimento e somente foram incluídas as crianças cujos pais concordassem com a pesquisa. Os exames virológicos foram realizados no Laboratório de Tecnologia Virológica de Bio-Manguinhos e no Laboratório de Vírus Respiratórios da Fiocruz-RJ. A pesquisa de anticorpos contra sarampo foi realizada pelos testes de neutralização por

redução de placa e IgM pela técnica de Elisa. A mediana de idade das crianças infectadas pelo HIV foi de 44,5 meses e das não infectadas 62 meses. Todos os pacientes soronegativos para HIV apresentaram títulos de anticorpos contra sarampo superiores a 50 mUI/mL, enquanto que entre as crianças infectadas somente 57,1% apresentaram títulos acima desse valor ($p = 0,0001$). O título médio geométrico de anticorpos neutralizantes foi significativamente menor no grupo infectado pelo HIV (433,5 mUI/mL) do que no grupo não infectado (1668,1 mUI/mL), $p = 0,001$. Todos os participantes, nos dois grupos, tiveram sorologia IgM para sarampo negativa. Em conclusão, as crianças infectadas pelo HIV tiveram menor soroprevalência de anticorpos contra o sarampo do que as não infectadas, e novas alternativas de imunização devem ser estudadas para proteger essas crianças contra o sarampo. Esse estudo salienta as dificuldades de imunização em pessoas infectadas perinatalmente pelo HIV. Todo o esforço deve ser feito para evitar a infecção perinatal pelo HIV, e caso esta ocorra, o monitoramento cuidadoso dos níveis de anticorpos contra doenças imunopreveníveis deve ser feito, na medida do possível, com reforços vacinais sempre que indicado.

5.3. Estudos clínicos com a vacina de poliomielite

5.3.1. Schatzmayr HG, Homma A 1969. Avaliação sorológica da vacina oral, tipo Sabin, contra a poliomielite, em região semi-rural: I. Formação de anticorpos em vacinados. *Rev Soc Bras Med Trop* 3:317-322

Instituição: Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Enterovírus, Fundação Ensino Especializado de Saúde Pública (FENSP).

Financiamento: sem informações.

Comentários. Já se havia observado que a vacinação contra poliomielite com a vacina oral (VOP) em países de clima tropical dava resultados menos satisfatórios do que em países de clima temperado. Diversos fatores poderiam contribuir para essa situação, inclusive menor imunogenicidade em regiões tropicais. O estudo em epígrafe visava obter informações sobre a resposta imunológica em uma área semi-rural, próxima a núcleos urbanos, no Estado do Rio de Janeiro. Foram vacinadas crianças entre 3 meses e 3 anos de idade, no município de Magé, distante cerca de 50 km da cidade do Rio de Janeiro. A maioria das crianças era de filhos de operários de uma fábrica de tecidos, atendidos em um Posto de Saúde. O nível sócio-econômico era razoável. Na área estudada a vacina oral tipo Sabin não havia sido introduzida em escala significativa e também não havia sido introduzida a vacina tipo Salk. Foram empregadas vacinas trivalentes, contendo 500.000, 200.000 e 300.000 TCD por dose, dos tipos 1, 2 e 3, respectivamente (vacinas do *Institute of Poliomyelitis*, de Moscou). Foram aplicadas 3 doses com intervalos de 8 semanas e as coletas foram realizadas concomitantes à 1ª e 3ª dose da vacina e 9 semanas após a última dose. As coletas foram feitas por punção venosa ou por punção na região do calcanhar, nesse último caso utilizando discos de papel de filtro. Soroconversão foi definida como passagem de título <1:8 na pré-vacinação para títulos ≥1:8 após a vacinação, anticorpos neutralizantes. O esquema de vacinação e de coletas de sangue foi completado em 114 crianças. Antes da vacinação, eram negativas para os 3 tipos de vírus da poliomielite 32 crianças, e 20 eram positivas para os 3 tipos. As soroconversões após 2

doses foram de 67,4%, 98,5% e 62,4% para os vírus 1, 2 e 3, respectivamente; após 3 doses, 82,7%, 98,5% e 75,4% para os vírus 1, 2 e 3, respectivamente. Esse estudo mostra que a VOP contendo 500.000, 200.000 e 300.000 TCD por dose confere imunidade insatisfatória para os sorotipos 1 e 3. Seguindo a orientação dos autores, a dose do tipo 1 foi aumentada para 1.000.000 TCID (o vírus selvagem tipo 1 predominava como causa de poliomielite nessa época). O aumento da dose do tipo 3 somente ocorreu muito mais tarde, como veremos adiante.

Figura 31. Grupo do Laboratório de poliomielite, participantes da cooperação Brasil-Japão



Fonte: Casa de Oswaldo Cruz

Da esquerda para a direita:

Dr. Terumasa Otsuka – Instituto Biken do Japão – Atuou como perito na transferência de tecnologia da vacina de sarampo CAM 70;

Dr. Shinobu Abe – Japan Poliomyelitis Research Institute (JPRI) – Especialista em neurovirulência em primatas não humanos, atuou como perito na transferência de tecnologia da vacina oral de poliomielite;

Luiz Antonio da Cunha – Tecnologista do Laboratório de Poliomielite de Bio-Manguinhos/Fiocruz;

Margareth Rose Martins - Tecnologista do Laboratório de Poliomielite de Bio-Manguinhos/Fiocruz;

Dr. Yutaka Doi - Japan Poliomyelitis Research Institute (JPRI), atuou como perito na transferência de tecnologia da vacina oral de poliomielite;

Maria da Luz Fernandes Leal – À época, Tecnologista do Laboratório de Poliomielite de Bio-Manguinhos/Fiocruz;

Dr. Akira Homma – À época, Superintendente de Bio-Manguinhos/Fiocruz;

Ishikawa San

Okada San (mestre de Sergio Dias de Oliveira)

5.3.2. Schatzmayr HG, Maurice Y, Fujita M, Fillipis AMB 1986. Serological evaluation of poliomyelitis oral and inactivated vaccines in an urban low-income population at Rio de Janeiro, Brazil. *Vaccine* 4:111-113.

Instituições: Instituto Oswaldo Cruz e Instituto Merieux

Financiamento: sem informações.

Comentários. Desde o início dos Dias Nacionais de Vacinação (DNV), em 1980, a poliomielite havia sido colocada sob controle, de cerca de 2.000 casos antes dos DNV para cerca de 50 por ano, em 1984. Entretanto, não se sabia se essa estratégia poderia ser mantida durante longo tempo, e a ocorrência de poliomielite causada pelo vírus atenuado da vacina, levaram à realização do presente estudo, que visava comparar a imunogenicidade das vacinas oral e inativada contra poliomielite, utilizadas concomitantemente com a vacina DTP. A população de estudo era de baixa situação sócio-econômica, que frequentava uma unidade de saúde. As vacinas foram aplicadas aos 2, 4 e 6 meses, concomitantemente à DTP, e sangue foi coletado antes da primeira dose, após duas doses (aos 6 meses de idade), e após a terceira dose (aos 9 meses de idade, antes da vacinação contra sarampo). A vacina oral trivalente, do Instituto Mérieux, continha 1.000.000, 100.000 e 300.000 TCD₅₀ por dose de poliovírus 1, 2 e 3 respectivamente. A vacina inativada foi formulada para as três doses com 40-8-32 D unidades de antígeno por dose. Para avaliar a imunogenicidade das vacinas foram realizados testes de neutralização. Foram incluídas no estudo 160 crianças, e foram avaliadas 155 crianças, das quais 75 receberam a vacina oral e 80 a vacina inativada. Os níveis de anticorpos obtidos com a vacina inativada foram mais altos do que com a vacina oral, especialmente para o tipo 3. Os autores discutem os achados e suas implicações para o controle da poliomielite. A vacina oral em populações de más condições sócio-ambientais é menos imunogênica, inferior à vacina inativada, mas ainda assim a imunogenicidade é boa. Os melhores níveis de anticorpos induzidos pela vacina inativada são uma vantagem, mas a aplicação de vacina injetável é mais difícil para vacinações em massa, além de ser mais cara. Deve ser considerada a possibilidade de uso da vacina inativada na rotina, concomitante à DTP.

As vantagens e desvantagens das vacinas oral e inativada são sublinhadas aqui, e apropriadamente os autores afirmam que ambas podem ser usadas, dependendo das circunstâncias. O uso da VOP, por conter vírus vivos atenuados, pode raramente causar poliomielite, por fatores ligados ao hospedeiro, ou a mutações do vírus vacinal. Por outro lado, a VOP confere melhor proteção de rebanho, pela indução de anticorpos secretórios, e pela facilidade de administração, facilitando maiores coberturas vacinais. As paralisias associadas às vacinas ocorrem geralmente após as primeiras doses. O Brasil, ao introduzir no PNI, em 2012, um esquema seqüencial, vacina inativada nas duas primeiras doses, e vacina oral para as doses restantes e mantendo os Dias Nacionais de Vacinação, combinou as vantagens de ambas as vacinas. A vacinação oral deverá ser suspensa quando se conseguir a erradicação da poliomielite.

Figura 32. Hermann G. Schatzmayr



5.3.3. Patriarca PA, Palmeira G, Lima Filho J, Cordeiro MT, Laender F, Oliveira MJC, Dantes MCS, Risi Jr JB 1988. Randomised Trial of alternative formulations of oral poliovaccine in Brazil. *Lancet* 27:429-432.

Instituições envolvidas: Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, EUA; Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro; Laboratório Regional de Virologia, Recife, Pernambuco; Departamento de Saúde, Pernambuco; Ministério da Saúde, Brasília, Brasil. Trabalho de campo em agosto de 1986.

Foi aplicado Termo de Consentimento, mas não há referência a Comissão de Ética.

Financiamento: sem informações.

Comentários. Em 1985 foi tomada a decisão pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) de erradicar a poliomielite das Américas até 1990, com apoio do Unicef, da Agência Internacional para Desenvolvimento dos Estados Unidos (USAID), do Banco Interamericano do Desenvolvimento (BID) e do Rotary Internacional. Na XXI Reunião do Conselho Diretivo da OPAS, em setembro de 1985, os países membros aprovaram essa iniciativa e se comprometeram com seu cumprimento. No Brasil, a interrupção da transmissão do vírus selvagem da poliomielite inseriu-se no programa de prioridades sociais do governo. Em 1986 foi criado o Grupo de Trabalho para a Erradicação da Pólio, e o Plano de Ação para a Erradicação da Poliomielite no Brasil foi aprovado pela Resolução CIPLAN nº 4, de 6 de fevereiro de 1986 (Nascimento 2011). Com o objetivo de erradicação da poliomielite, intensificaram-se as ações de imunização e de vigilância epidemiológica, com a instituição de uma comissão revisora de casos suspeitos, com a participação de neurologistas, virologistas, pediatras e outros profissionais. A taxa de incidência da poliomielite havia caído de 10 por 100.000 a menos de 1 por 100.000, entre 1980 e 1985. Com a queda da incidência, houve um certo relaxamento nas coberturas vacinais, que caíram. Em fevereiro de 1986, foi detectado um surto no nordeste do Brasil, com mais de 350 casos de paralisia em quatro meses. A maioria dos casos foi causada pelo tipo 3. Campanhas suplementares de vacinação tiveram pouco efeito para controle da epidemia. A prevalência de anticorpos contra o tipo 3 era baixa entre crianças na região, a despeito de coberturas

vacinais para 3 doses ou mais de 75-80%. A eficácia clínica de três doses de vacina oral da poliomielite (VOP), de 85% em 1985, quando predominava o tipo 1, caiu para 55% em 1986. Não tinha havido mudanças relevantes na sequência genética do tipo 3, nem quebras da cadeia de frio, então falha vacinal tipo-específica parecia a causa mais provável para o surto. Num esforço para controlar a epidemia, foi utilizada uma vacina monovalente tipo 3 em 3 milhões de crianças, e uma nova formulação da vacina trivalente (TVOP) em 1,5 milhões de crianças. O estudo em epígrafe foi realizado para avaliar essa nova formulação da vacina trivalente, em Recife, Pernambuco.

Foram incluídas crianças de nove creches de Recife, com menos de cinco anos, e que haviam recebido de 0 a 4 doses de TVOP, mas nenhuma dose nos últimos 30 dias. Somente foram incluídas crianças cujos pais concordaram com o Termo de Consentimento. Três formulações de vacina foram utilizadas: trivalente com 300.000 partículas de vírus tipo 3, trivalente com 600.000 partículas de vírus do tipo 3 e monovalente com 300.000 partículas do vírus do tipo 3. Todas as três vacinas foram preparadas no Brasil por Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro. Das 734 crianças incluídas, 441 (60%) fizeram a segunda coleta de sangue. A soroconversão para o tipo 3 foi muito maior com a nova formulação ou com a vacina monovalente tipo 3 do que com a formulação usada até então. Para os tipos 1 e 2, as soroconversões foram semelhantes com a nova formulação ou com a vacina padrão.

Esse estudo mostrou que três doses da vacina TVOP padrão podem não proteger satisfatoriamente. Verificou-se que crianças com até quatro doses de TVOP padrão não estavam protegidas contra o tipo 3. Em outros países também se observou baixa proteção contra o tipo 1 com a vacina usada até então (Gambia, Senegal e Taiwan). A melhor resposta ao tipo 3 deveu-se a uma proporção diferente das doses dos 3 tipos, de 10:1:3 para 10:1:6, o que diminuiu a interferência do tipo 2.

Em estudo sorológico realizado no Espírito Santo, já se havia percebido a necessidade de aumentar a quantidade de vírus do tipo 3, o que não foi valorizado na época (Bastos et al. 1974). No estudo anterior já havíamos visto uma menor imunogenicidade da vacina oral trivalente em relação à inativada, principalmente para os sorotipos 1 e 3. O presente estudo mostrou que aumentando a concentração do vírus atenuado tipo 3 a resposta sorológica para este tipo melhorou acentuadamente, o que serviu de base para a mudança na formulação da vacina oral, trivalente, da

poliomielite, e permitiu o controle do surto no Nordeste do Brasil. Essa nova formulação passou a ser utilizada em todo o mundo e foi fundamental para o controle da poliomielite no Nordeste do Brasil.

As vacinas foram preparadas sob a direção de Akira Homma e Fernando Lopes, em Bio-Manguinhos. Instituíram-se Dias de Vacinação Nordestina, em acréscimo aos Dias Nacionais de Vacinação e incrementou-se a vigilância epidemiológica. Finalmente, os últimos casos foram notificados no Rio Grande do Norte e Paraíba, em 1989. Nas Américas, o último caso ocorreu no Peru, em 1991.

5.3.4. Comentários finais sobre os estudos com a vacina de poliomielite

A contribuição da Fiocruz para a erradicação da poliomielite no Brasil foi muito mais ampla e decisiva do que esses dois estudos clínicos mostram. Schatzmayr et al. (2002) fizeram uma minuciosa revisão desse assunto.

A OPAS, em 1960, por meio de um convênio com o IOC, montou um laboratório de enterovirose no Pavilhão Rockefeller, no *campus* de Manguinhos, Fiocruz. O laboratório funcionou até 1964, sendo desenvolvidas novas metodologias de diagnóstico que permitiram o esclarecimento de casos de paralisia flácida aguda. Também nessa fase no IOC realizou-se o trabalho de formulação final da vacina oral trivalente, a partir de concentrados importados, utilizando-se sacarose como estabilizador do produto. A vacina era titulada e distribuída para todo o país. O IOC colaborou na montagem de um laboratório no Instituto Pasteur, hoje Noel Nutels, dando prosseguimento aos estudos sobre poliomielite.

A partir de 1967, criou-se um Laboratório de Virologia no Departamento de Ciências Biológicas da ENSP, onde se reiniciaram as pesquisas sobre enterovírus, relevantes para o controle da doença no Brasil, como estudos sobre a imunogenicidade da vacina, e pesquisa de vírus da poliomielite em amostras ambientais.

Em 1980, o Laboratório de Virologia da ENSP foi transferido para o IOC, tendo sido credenciado como Centro Nacional de Referência para Enterovírus (CNRE), e posteriormente pela OPAS, como Centro Colaborador para Enterovírus. Com o apoio do Instituto Pasteur, de Paris, foi introduzida no Brasil a técnica de diferenciação intratípica, substituída posteriormente pela técnica Dot-blot, desenvolvida no Centers for Disease Control de Atlanta, EUA.

A nova metodologia foi fundamental para o programa de erradicação, pois permitia afirmar a origem selvagem ou vacinal das amostras isoladas, e essa técnica foi padronizada para ser utilizada por toda a rede credenciada. Em 1991, foi introduzida a técnica de transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), que permite a detecção do genoma viral em pequenas quantidades.

Outras técnicas avançadas de biologia molecular foram introduzidas no CNRE, que permitiram investigar casos suspeitos de poliomielite no Brasil e outros países.

A Fiocruz participou ativamente da formação de recursos humanos, treinando técnicos da rede de laboratórios regionais e internacionais.

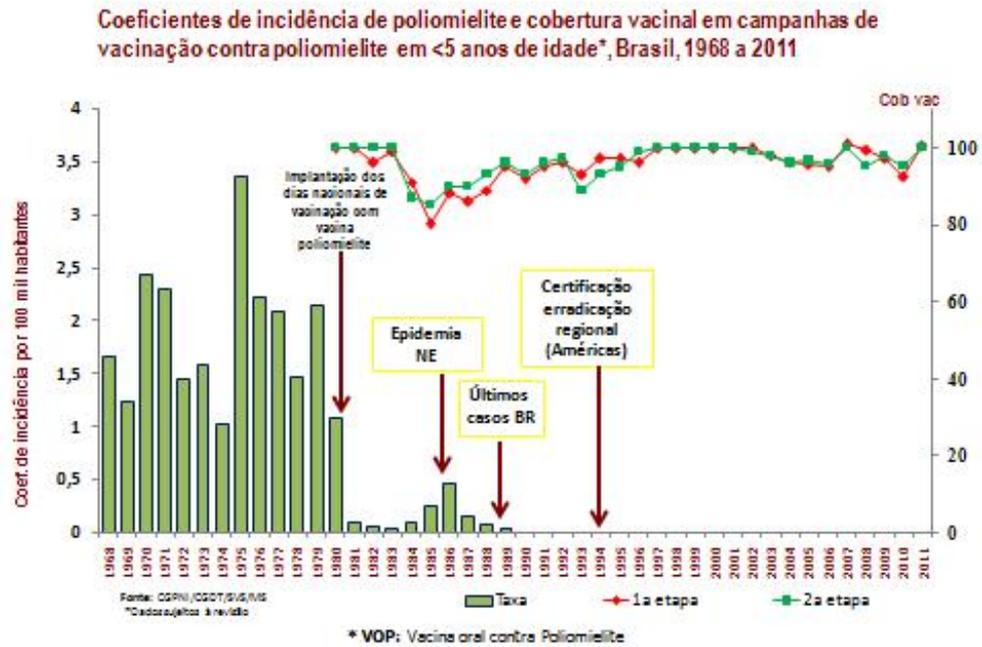
A introdução da técnica de seqüenciamento nucleotídico, em 1990, permitiu confirmar a origem vacinal dos vírus isolados de casos raros de poliomielite surgidos após 1989.

Em 1981, no contexto do acordo de cooperação técnica com o Japão, que já descrevemos no capítulo de sarampo, o Departamento de Virologia do IOC colaborou para o estabelecimento e organização do Laboratório de Controle de Qualidade da Vacina Oral contra a Poliomielite. Essa metodologia foi repassada, posteriormente, para o Instituto nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

Bio-Manguinhos iniciou o desenvolvimento da formulação da vacina a partir de concentrado de vírus importado; além disso, introduziu um melhor termoestabilizador e aperfeiçoou a formulação da vacina, como vimos.

Como afirmam Schatzmayr et al. (2002), a estratégia foi correta, pois, quando houve o surto de poliomielite no Nordeste, Bio-Manguinhos disponibilizou em apenas 20 dias a vacina monovalente sorotipo 3, e trivalente potencializada para o sorotipo 3, enquanto os produtores externos solicitaram seis meses para atender à solicitação do Brasil. Essa formulação potencializada para o tipo 3 foi incorporada pela OPAS para imunização em todos os países da América Latina e posteriormente a OMS adotou-a para todos os países de clima tropical. A participação da Fiocruz foi fundamental para o êxito do programa de erradicação do vírus selvagem da poliomielite do Brasil e das Américas (Figura 33).

**Figura 33. Coeficientes de incidência de poliomielite e cobertura vacinal
Campanhas de vacinação contra poliomielite em < de 5 anos de idade, Brasil, 1968 a
2011 (*)**



(*) As colunas representam o coeficiente de incidência por 100.000 habitantes e as linhas as coberturas vacinais.

5.4. Estudos clínicos com a vacina BCG

5.4.1. Camacho LAB, Klein CH 1990. Risco de infecção tuberculosa entre escolares com alta cobertura pelo BCG. *Bol Of Sanit Panam* 108:100-112.

Instituições envolvidas: OMS, Fiocruz e Divisão Nacional de Pneumologia Sanitária/MS.

Sem informações sobre Comissão de Ética.

Financiamento: OMS, Fiocruz e Divisão Nacional de Pneumologia Sanitária/MS.

Comentários. O diagnóstico da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* pela prova tuberculínica é difícil em populações vacinadas com o BCG e expostas a infecções por micobactérias atípicas. O estudo em apreço partiu de alguns pressupostos: (1) a hipersensibilidade específica (ao bacilo de Koch) é duradoura e não influenciável pela aplicação do BCG ou por outras micobactérias; (2) as infecções específicas (pelo *M. tuberculosis*) e as não-específicas (por micobactérias atípicas) podem ser distinguidas pelo tipo de resposta à tuberculina antes e após estimulação com o BCG, metodologia proposta por Ten Dam & Hitze (1980). Essa metodologia consistia em aplicar BCG e prova tuberculínica, repetindo a prova tuberculínica algumas semanas depois. São considerados infectados os indivíduos que, na pós-vacinação, não apresentarem aumento da sensibilidade tuberculínica, em relação à pré-vacinação. Através de análise estatística é possível calcular a prevalência da infecção pelo bacilo de Koch na população. No estudo em epígrafe, foram estudados 1721 escolares de seis a dez anos de idade, dos quais 91% tinham sido comprovadamente vacinadas com BCG. Foi aplicado BCG e teste tuberculínico (PPD), repetido 12 a 20 semanas após. Aplicando-se a metodologia de Dam e Hitze, encontrou-se uma taxa de infecção tuberculosa de 4,13%. Esse estudo utilizou o BCG como método de avaliação da prevalência de infecção tuberculosa em populações, em associação com o PPD. O uso do BCG ao nascimento introduz mais uma variável, mas não parece comprometer os pressupostos ou a metodologia. Para o diagnóstico de infecção tuberculosa ativa em casos individuais a metodologia não é aplicável. O

diagnóstico oportuno de tuberculose ativa sempre foi um problema, pois o teste tuberculínico é de difícil interpretação, tem resultados falso-negativos, e o cultivo do *M. tuberculosis* é demorado. A técnica de exame direto pela qPCR (reação em cadeia de polimerase quantitativa) deverá melhorar essa situação (Albuquerque et al, 2014).

5.4.2. Barbosa T, Arruda S, Fernandes BD, Carvalho LP, Cardoso S, Cunha S, Barreto ML, Pereira SM, Rodrigues LC, Barral-Netto M 2003. BCG (Bacille of Calmette-Guérin) revaccination leads to improved in vitro IFN- γ response to mycobacterial antigen independent of tuberculin sensitization in Brazilian school-age children. *Vaccine* 21:2152-2160

Instituições envolvidas: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz, Bahia; Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia; Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia; Instituto de Saúde Coletiva, Salvador, Bahia; London School of Hygiene and Tropical Medicine, Londres.

Não há referência a Comissão de Ética, mas aplicou-se Termo de Consentimento.

Financiamento: CNPq, Ministério da Saúde, Fiocruz, e Departamento de Desenvolvimento Internacional do Reino Unido.

Comentários. A vacinação com BCG por via intradérmica é recomendada no Brasil desde 1976. Alguns estudos feitos no Brasil apontam para um efeito protetor contra meningite tuberculosa e hanseníase. Outros estudos apontam para um declínio da proteção contra tuberculose à medida que aumenta o tempo decorrido desde a vacinação, o que levou à recomendação de revacinar com o BCG na idade escolar. Por outro lado, há evidentes limitações na proteção do BCG contra tuberculose pulmonar. Estudos de vacinas alternativas têm sido difíceis de realizar, tendo em vista o grande número de indivíduos que precisariam ser vacinados, e por questões éticas, devido ao longo tempo de acompanhamento necessário para avaliar a efetividade de uma nova vacina. Seria, assim, extremamente importante dispor de marcadores sorológicos de proteção, que pudessem viabilizar estudos com novas vacinas. O estudo em epígrafe foi realizado em crianças de 7 a 15 anos, escolares de Salvador, Bahia, que constituíam uma subamostra de grande estudo de revacinação BCG, iniciado em 1996, para avaliar a efetividade da revacinação BCG no Brasil. Foi feito teste tuberculínico e aplicado BCG ID (cepa Moreau, Rio de Janeiro). Nova coleta de sangue e novo PPD foram realizados oito semanas depois. Após diluição da amostra sanguínea, o sangue foi colocado em dois poços, um deles foi estimulado com filtrado de sobrenadante de cultura de *M.*

tuberculosis e outro poço ficou sem tratamento. Dentre 136 amostras de sangue pré-revacinação BCG, 134 foram avaliadas para TNF- α e 122 foram avaliadas para IFN- γ . Foram avaliadas 131 amostras pós-revacinação BCG para IFN- γ e TNF- α . Por dificuldades técnicas, somente foram avaliadas 42 amostras pós-revacinação BCG para IL-10.

A maioria das crianças não respondeu ao teste tuberculínico antes da revacinação BCG. Nove crianças eram reatoras fracas e apenas uma era forte reatora. Nenhuma das citocinas guardou relação com a reatividade cutânea à tuberculina ($p > 0,05$, teste de correlação de Spearman). Níveis detectáveis de produção de interferon gama foram encontrados antes da revacinação em 70% das crianças avaliadas, e foram mais freqüentes nas crianças com menos de 11 anos. Nestas amostras positivas para interferon gama, houve uma correlação positiva entre a produção de IFN- γ e TNF- α , o que pode indicar a capacidade de produzir uma resposta T_H1 contra micobactérias. Portanto, houve resposta de produção de IFN- γ na maioria das crianças não reatoras ao PPD, especialmente em crianças de 7 a 11 anos de idade.

Oito semanas após a revacinação, 78% das crianças não reatoras ao PPD tornaram-se reatoras, após novo PPD. Não houve correlações entre reatividade ao PPD após revacinação e produção de citocinas. A revacinação BCG foi capaz de aumentar a produção de IFN- γ em crianças com baixos níveis de IFN- γ antes da revacinação, mas nas crianças com níveis mais altos não houve aumento estatisticamente significativo.

A avaliação de imunidade à tuberculose sempre foi difícil, pois a reatividade ao PPD pode indicar imunidade ou infecção, e pode haver infecções graves em não reatores ao PPD. O estudo em apreço indica que a resposta de produção de citocinas após estimulação *in vitro* com antígeno micobacteriano, especialmente de IFN- γ , pode ser um indicador de proteção contra a doença, e poderia talvez ser utilizado como um marcador sorológico de imunogenicidade em estudos clínicos com novas vacinas contra tuberculose.

5.4.3. Oliveira ES, Marinho JM, Barbosa T 2013. Interferon-gamma production by mononuclear cells in Bacille Calmette-Guérin-revaccinated healthy volunteers predicted long-term antimycobacterial responses in a randomized controlled trial. *Vaccine* 31:3778-3782

Instituições envolvidas: Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia; Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, Fiocruz, Salvador, Bahia; Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia; Hospital Santa Izabel, Salvador, Bahia

Estudo aprovado pela Comissão de Ética do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.

Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, CNPq e CAPES.

Comentários. Em grande estudo, em Salvador, Bahia, após acompanhamento de nove anos, a revacinação BCG mostrou uma proteção fraca contra a tuberculose, 19% (IC 95% 3%; 33%), em comparação com o grupo somente vacinado ao nascimento (Barreto et al. 2011). Como vimos no estudo anterior, um subgrupo do estudo principal, a resposta de IFN- γ a antígenos micobacterianos estava aumentada em uma fração das crianças revacinadas. O estudo em epígrafe procurou saber se o aumento de produção de IFN- γ a estímulo com antígenos micobacterianos após a revacinação poderia estar associado com a frequência de IFN- γ^+ /CD4 $^+$ e CD8 $^+$, assim como predizer a resposta ao mesmo estímulo um ano após a revacinação. Essa informação poderia contribuir para obter parâmetros de avaliação imunológica para avaliar novas propostas de imunização contra tuberculose. O estudo foi randomizado, controlado, prospectivo, e incluiu universitários de 18 anos ou mais de idade, vacinados com BCG na idade pré-escolar, que apresentavam cicatriz de BCG, e eram tuberculino negativos e HIV 1 e 2 negativos. Foi obtido termo de consentimento de todos os participantes. Foi coletado sangue nos tempos 0 (T0), 2 meses (T2) e 12 meses (T12) após a primeira intervenção. Foi feita revacinação BCG com a cepa Moreau-RJ da Fundação Atauilpho de Paiva, e o grupo controle não foi revacinado. Foram incluídos 29 participantes no grupo controle e 46 no grupo revacinado com BCG. Foram realizadas culturas de sangue total com ou sem lisado de *M. tuberculosis*. Células mononucleares (PBMCs)

foram obtidas das coletas T0 e T2. As células foram plaqueadas com ou sem estímulo de fitohemaglutinina, ou *M. bovis* BCG Moreau-RJ. As citocinas foram mensuradas nos sobrenadantes das culturas. Os sobrenadantes T0 e T2 foram avaliados simultaneamente, enquanto os sobrenadantes T12 foram avaliados um ano após. As células T produtoras de citocinas e granzime A foram avaliadas por citometria de fluxo e anticorpos fluorescentes. O achado mais significativo foi que a razão T2/T0 na produção de INF- γ após estimulação com lisado de *M. tuberculosis* prediz a resposta de INF- γ 12 meses após a revacinação. O grupo cuja razão T2/T0 na produção de INF- γ foi maior do que 3,262 teve maior probabilidade de mostrar aumento na expansão de linfócitos T produtores de INF- γ aos 12 meses após a revacinação, indicando que esses indivíduos continuavam protegidos contra tuberculose. Esse achado pode ser útil, como marcador sorológico de proteção, para orientar as pesquisas de novas vacinas contra a tuberculose. Os autores consideram que a os ensaios de liberação de INF- γ são relativamente baratos, altamente reprodutíveis, e facilmente aplicáveis a grandes estudos clínicos.

Esses achados são interessantes, mas podem refletir muito mais uma característica do hospedeiro do que um efeito da vacinação ou revacinação BCG *per se*. Isto é, a resposta imunológica ao BCG pode identificar indivíduos cujo sistema imunológico é predisposto a ter maior resistência (ou maior suscetibilidade) à infecção pelo *M. tuberculosis*.

5.5. Estudos clínicos com a vacina contra hepatite B

5.5.1. Motta MSF, Mussi-Pinhata MM, Jorge SM, Yoshida CFT, Souza CBS 2002.
Immunogenicity of hepatitis B vaccine in preterm and full term infants vaccinated within the first week of life. *Vaccine* 20:1557-1562.

Instituições envolvidas: Departamento de Pediatria, Escola de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo; Departamento de Virologia, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Estudo aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Universitário.

Financiamento: CNPq e Fundação de Apoio ao Ensino e à Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA).

Comentários. Os resultados dos estudos sobre imunogenicidade da vacina de hepatite B em recém-nascidos pré-termo mostravam resultados conflitantes, e esse estudo visou esclarecer essa questão. Foram incluídos 110 neonatos (57 a termo e 53 pré-termo), filhos de mães HBsAg negativas. As crianças pré-termo incluídas tinham menos de 1.800 g. Foram aplicadas três doses de vacina Engerix B[®] de GSK, 0,5 mL (10 µg) por via intramuscular na área ântero-lateral da coxa, no esquema 0-1-6 meses. A primeira dose foi aplicada durante a primeira semana de vida. A imunogenicidade foi avaliada três meses após a terceira dose. A soroconversão nos prematuros foi de 77% (IC95% 64,7; 87,1) e nas crianças a termo de 98% (IC95% 91,6; 99,9). Os TMGs das crianças pré-termo foi de 186,6 mUI/mL e nas crianças a termo foi de 537,5 mUI/mL. Esse estudo demonstrou que pequenos prematuros têm menor soroconversão à vacinação contra hepatite B e que o esquema de rotina pode não ser adequado. Por essa razão, o Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2006) recomenda uma dose adicional de vacina hepatite B aos dois meses de idade (esquema 0-1-2-6 meses).

5.5.2. Martins RM, Bensabath G, Arraes LC, Oliveira MLA, Miguel JC, Barbosa G, Camacho LAB 2004. Multicenter study on the immunogenicity and safety of two recombinant vaccines against hepatitis B. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99:865-871.

Instituições envolvidas: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde; Instituto Evandro Chagas, Ministério da Saúde, Belém, Pará; Instituto Materno-Infantil de Pernambuco, Recife; Departamento de Virologia, Centro de Referência Nacional de Hepatites Virais, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; Lar de Frei Luiz, Rio de Janeiro; Escola Nacional de Saúde Pública, Fiocruz, Rio de Janeiro.

Estudo aprovado pelas Comissões de Ética das instituições envolvidas nos trabalhos de campo.

Financiamento: PNI/MS.

Comentários. A vacina de hepatite B recombinante importada era a mais cara do PNI, e em 1995 era responsável por 73% dos custos com vacinas do PNI, embora neste ano a cobertura vacinal fosse baixa. A obtenção de uma vacina recombinante pelo Instituto Butantan foi uma etapa importante na produção nacional de vacinas. Sua formulação era praticamente igual a outras vacinas licenciadas contra hepatite B, mas era produzida pelo levedo *Hansenulla polymorpha* em vez de *Saccharomyces cerevisiae*. Os estudos pré-licenciamento foram realizados apenas em adultos e incluíram pequeno número de participantes (Costa et al. 1997; Ioshimoto et al. 1999). Frente a questionamentos da comunidade científica e do Comitê Assessor em Imunizações do Programa Nacional de Imunizações, o Ministério da Saúde decidiu patrocinar um grande estudo capaz de responder aos questionamentos e dúvidas. Esse estudo multicêntrico foi realizado em faixas etárias desde recém-nascidos até adultos de 40 anos e mostrou que a vacina do Instituto Butantan era aceitável para utilização na rotina dos serviços de saúde, até os 20 anos de idade. O estudo em apreço permitiu a utilização da vacina recombinante do Instituto Butantan pelo PNI, mas apontou para a necessidade de sua melhoria. Isso foi feito, como veremos nos dois próximos estudos. A produção de vacina de hepatite B recombinante pelos laboratórios asiáticos fez cair o preço para um dólar a dose, e após a sua produção pelo Instituto Butantan,

para 0,28 dólares a dose. Esse estudo é apresentado na íntegra na segunda parte dessa tese.

5.5.3. Luna EJ, Moraes JC, Silveira L, Salina HSN 2009. Efficacy and safety of the Brazilian vaccine against Hepatitis B in newborns. *Rev Saúde Pública* 43:1-6.

Instituições envolvidas: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo; Departamento de Medicina Social da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo; Hospital Geral de Guarulhos, São Paulo.

Estudo aprovado pela Comissão de Ética da Irmandade de Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

Financiamento: FAPESP, Anvisa, Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, e Ministério da Saúde

Comentários. Como vimos anteriormente, a vacina recombinante de hepatite B do Instituto Butantan, Butang[®], embora aceitável, era inferior à vacina de referência (Engerix B[®], do laboratório GlaxoSmithKline). Esse estudo foi feito após reformulação da vacina, em que a dose de 0,5 mL passou de 10 µg para 12,5 µg. Embora não tenham sido incluídos entre os autores, as dosagens foram feitas no Instituto Oswaldo Cruz, e o estudo teve apoio importante da Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos, pelo que o incluímos aqui. O estudo foi feito em duas etapas. Na primeira etapa, as sorologias foram feitas no Instituto Adolfo Lutz e no Instituto Evandro Chagas. Na segunda etapa, no Instituto Oswaldo Cruz, e uma subamostra foi retestada no IEC. Na primeira etapa, com a vacina na sua formulação original, a soroproteção (anti-HBs ≥ 10 mUI/mL) foi de 92,5% (247/267) no grupo da vacina Butang[®] e de 98,5% (267/271) no grupo da vacina Engerix B[®] de GSK, e o intervalo de confiança de 95% da diferença de -6% foi de -9,5;-2,5. Os títulos médios geométricos foram de 420,8 mUI/mL e 1.769,9 mUI/mL, respectivamente. Na segunda etapa, com a vacina reformulada, não houve diferença de soroconversão entre as duas vacinas, 100% com a vacina Butang[®] (242/242) e 99,2% com a vacina Engerix B[®] (241/243). Entretanto, os TMGs foram de 2.616 mUI/mL e 10.051 mUI/mL, respectivamente, com diferença estatisticamente significativa. Na retestagem cruzada, houve alta correlação intraclasse entre os resultados dos diferentes laboratórios. Esse estudo permitiu a utilização da vacina de hepatite B do Instituto Butantan reformulada em recém-nascidos, sem restrições.

**5.5.4. Motta-Castro ARC, Gomes SA, Yoshida CFT, Miguel JC, Teles SA, Martins RMB
2009. Compliance with and response to hepatitis B vaccination in remaining
quilombo communities in Central Brazil. *Cad Saude Pública* 25:738-742.**

Instituições envolvidas: Departamento de Farmácia-Bioquímica, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande; Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; Faculdade de Enfermagem, Universidade Federal de Goiás, Goiânia; Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

Estudo aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Termo de consentimento.

Financiamento: CNPq.

Comentários. Estudo realizado em quilombos (comunidades isoladas que reúnem descendentes de escravos fugidos de minas de ouro ou fazendas) em Mato Grosso do Sul. Foram estudados 708 indivíduos de oito comunidades suscetíveis à hepatite B, de dois a 95 anos, após termo de consentimento. Foi aplicada a vacina Engerix B[®] de GSK, três doses, no esquema 0-1-6 meses, e sangue foi coletado 45 dias após a última dose. Completaram o esquema vacinal 198 participantes e 148 fizeram a coleta de sangue pós-vacinal. Soroconverteram 123 participantes (83,1%), dos quais apresentaram títulos altos (>100 mIU/mL) 58 participantes (59,5%) e apresentaram títulos baixos (10-100 mIU/mL) 35 participantes (23,6%). Foram associados à não-resposta imunológica dois fatores: sexo masculino e idade ≥ 40 anos. Os autores salientam a necessidade de programas de educação para a saúde e esquemas alternativos de vacinação para melhorar as coberturas vacinais nessas populações do Brasil Central. Esse estudo põe em relevo as dificuldades de vacinação nas pequenas comunidades do interior do Brasil, problema persistente até os dias de hoje. A heterogeneidade das coberturas vacinais é um imenso desafio.

5.5.5. Moraes JC, Luna EJA, Grimaldi RA 2010. Immunogenicity of the Brazilian hepatitis B vaccine in adults. *Rev Saúde Pública* 44:1-5

Instituições envolvidas: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; Instituto de Medicina Tropical de São Paulo; Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo.

Protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

Financiamento: Ministério da Saúde.

Tal como o anterior, embora não constando entre os autores, esse estudo teve a participação importante do Instituto Oswaldo Cruz nas dosagens sorológicas, pelo que o incluímos aqui.

Comentários. Já havíamos visto em 5.5.2. que a vacina recombinante do Instituto Butantan, Butang[®], embora aceitável para utilização em adultos jovens, não poderia ser recomendada para pessoas com 31 a 40 anos de idade, por ser muito menos imunogênica nessa faixa etária. O Instituto Butantan, como vimos, reformulou a vacina aumentando a concentração de HBsAg. Esse estudo foi feito com a nova formulação. Foi aplicado 1 mL/dose, ou seja, 25 µg/dose. Foram incluídos 564 policiais militares saudáveis, de 31 a 40 anos, sem marcadores sorológicos para hepatite B e não reagentes ao HIV. Destes, cumpriram o protocolo 216 participantes no grupo da vacina Butang[®] e 203 no grupo da vacina Engerix B[®]. As amostras da primeira coleta foram testadas no Laboratório Central da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, e as segundas e terceiras amostras foram testadas no Instituto Oswaldo Cruz. Soroproteção foi definida como título de anti-HBs ≥ 10 mUI/ml. A soroproteção da vacina Butang[®] foi de 98,6% e da vacina Engerix B[®] foi de 95,6%. Títulos elevados de anti-HBs (>100 mUI/mL) foram observados em 95,4% dos participantes do grupo Butang[®] e em 84,7% dos participantes do grupo Engerix B[®]. Os TMGs foram de 12.577 mUI/mL e 11.673 mUI/mL, respectivamente. Foi feita retestagem cruzada e randomizada para anti-HBs de uma subamostra, entre os laboratórios envolvidos, com um coeficiente de correlação intraclasses de 0,973, o que indica a alta acurácia dos testes sorológicos. Ambas as vacinas foram bem toleradas, embora na 3ª dose a

freqüência de eventos adversos tenha sido maior com a vacina Butang®. Concluiu-se que as duas vacinas foram equivalentes em termos de imunogenicidade e reatogenicidade na população de 31 a 40 anos. Esse estudo permitiu a utilização da vacina de hepatite B do Instituto Butantan nas mesmas indicações das outras vacinas disponíveis no mercado. Uma grande vitória, que fortaleceu a indústria nacional de vacinas, deu confiança aos profissionais da saúde, e mostrou o acerto do Ministério da Saúde em exigir estudos clínicos convincentes com a vacina de produção nacional.

5.5.6. Potsch DV, Oliveira MLA, Ginuino C, Miguel JC, Oliveira SAN, Silva EF, Moreira RB, Cruz GVM, Oliveira ALVSM, Camacho LAB, Barroso PF 2010. High rates of serological response to a modified hepatitis B vaccination schedule in HIV-infected adults subjects. *Vaccine* 28:1447-1450.

Instituições envolvidas: Centro de Vacinação de Adultos, Escola de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro; Serviço de Doenças Infecciosas, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Departamento de Medicina Preventiva, Escola de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro; Laboratório de Referência Nacional para Vírus Respiratórios e Doenças Exantemáticas, Fiocruz; Laboratório de Referência Nacional para Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz; Escola Nacional de Saúde Pública, Fiocruz.

Estudo aprovado pelo “Institutional Review Board” da Escola de Medicina e do HUCFF-UFRJ.

Financiamento: sem informações.

Comentários. A co-infecção pelo vírus da hepatite B é responsável por alta morbidade e mortalidade entre as pessoas infectadas pelo HIV-1. Mortes atribuíveis às complicações da hepatite B são relevantes nessa população. Desse modo, evitar a infecção pela hepatite B em pessoas com HIV/AIDS é de grande importância. Entretanto, as respostas imunes às doses padrão são mais baixas em pessoas infectadas pelo HIV do que na população geral, principalmente entre adultos. Além disso, essas pessoas têm declínio mais rápido da imunidade após vacinação contra hepatite B do que população geral, principalmente entre adultos. Ainda não foi estabelecido um esquema para vacinação contra hepatite B em pessoas infectadas pelo HIV, por falta de dados. Vários autores relataram que um esquema de vacinação de três doses com o dobro da dose (40 µg de HBsAg), melhora a resposta imune, principalmente em pessoas com contagens mais altas de células CD4.

Esse estudo avaliou um esquema modificado de vacinação contra hepatite B, em 47 pessoas infectadas pelo HIV e sem evidência sorológica de infecção anterior pelo vírus da hepatite B (30 mulheres e 17 homens). A idade média foi de 36 anos, variando de 21 a 58 anos. A mediana de células CD4 foi de 402 células/mm³, e 70%

tinham carga viral de HIV abaixo de 80 cópias/mL. A vacina de hepatite B utilizada era recombinante (Euvax B®), a dose foi de 40µg (dobro da dose usual), e o esquema utilizado foi o de 0-1-2-6 meses. Foi considerada soroproteção título de anti-HBsAg ≥ 10 mUI/mL. Resposta protetora (≥ 10 mUI/mL) foi obtida por 89% dos participantes, sendo que 78% e 60% desenvolveram títulos acima de 100 mUI/mL e 1000 UI/mL, respectivamente. A resposta imune foi muito melhor nos participantes que tinham carga viral abaixo do limite de detecção.

O estudo seguinte amplia esta pesquisa.

5.5.7. Potsch DV, Camacho LAB, Tuboi S, Villar LM, Miguel JC, Ginuino C, Silva EF, Mendonça RMM, Moreira RB, Barroso PF 2012. Vaccination against hepatitis B with 4-double doses increases response rates and antibodies titers in HIV-infected adults. *Vaccine* 30:5973-5977.

Instituições envolvidas: Universidade Federal do Rio de Janeiro; Laboratório de Referência Nacional para Hepatites Virais/Fiocruz; ENSP/Fiocruz; Universidade Federal Fluminense.

Estudo aprovado pelo “Institutional Review Board” da Escola de Medicina e do HUCFF-UFRJ.

Financiamento: sem informações.

Comentários. Esse estudo completa o anterior. Cento e sessenta e três adultos infectados pelo HIV cumpriram todas as exigências do protocolo, inclusive nenhuma evidência sorológica de infecção ou imunização prévia à hepatite B. Houve um predomínio de mulheres, com idade mediana de 37 anos, não fumantes, com uma proporção importante de pessoas com sobrepeso ou obesidade. A grande maioria estava em tratamento (HAART), tinha contagens de CD4 acima de 350 células/mm³, e carga viral abaixo do limite de detecção. A vacina de hepatite B utilizada era recombinante (Euvax B[®]), a dose foi de 40 µg (dobro da dose usual), e o esquema utilizado foi o de 0-1-2-6 meses. Foi considerada soroproteção título de anti-HBsAg ≥10 mUI/mL. Soroproteção foi obtida em 83% e 91% das pessoas após 3 e 4 doses, respectivamente. Em um modelo de regressão logística multivariada, a carga viral de HIV-1 e contagens de CD4 mais altas foram preditoras independentes de resposta imune vigorosa após 4 doses. Os participantes com carga viral indetectável tinham probabilidade quase três vezes maior de obterem títulos de anti-HBs acima de 100 mUI/mL do que aqueles com carga viral detectável. A distribuição cumulativa reversa dos títulos após a 3^a e a 4^a dose mostrou claramente a importância da 4^a dose.

Conclui-se que um esquema vacinal de 4 doses, com o dobro da dose da vacina de hepatite B, deve ser considerada para adoção em saúde pública, em pessoas infectadas pelo HIV. São poucos e com pequena amostragem os estudos de vacinas em pessoas infectadas pelo HIV e pessoas com outras imunodeficiências. Esse estudo é

um dos mais completos sobre o assunto, respalda o estudo preliminar revisado em 5.5.4., e a utilização do esquema 0-1-2-6 meses, com o dobro da dose, nesse grupo de pessoas.

5.6. Estudos clínicos com a vacina tetravalente DTP/Hib

5.6.1. Clemens SA, Azevedo T, Homma A 2003. Feasibility study of the immunogenicity and safety of a novel DTPw/Hib (PRP-T) Brazilian combination compared to a licensed vaccine in healthy children at 2, 4, and 6 months of age. *Rev Soc Bras Med Trop* 36:321-330.

Instituições envolvidas: Instituto Carlos Chagas, Rio de Janeiro; Universidade Federal do Rio de Janeiro; Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Protocolo aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Carlos Chagas.

Financiamento: GSK.

Comentários. O advento da vacina conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b representou um grande progresso, devido à sua efetividade e segurança, virtualmente eliminando a meningite por essa causa em vários países. A introdução dessa vacina no Brasil, em 1999, sob a forma monovalente (isto é, não combinada), mostrou impacto imediato na incidência da doença. Entretanto, a vacina Hib era importada e adicionava três injeções ao calendário vacinal. Seria importante reduzir o número de injeções, combinando a vacina Hib à vacina DTP, como já havia sido feito em muitos países, com sucesso. Entretanto, era necessário saber se a vacina importada, de GlaxoSmithKline, poderia ser combinada com a vacina DTP, produzida no Instituto Butantan. Esse estudo teve como objetivo realizar essa investigação. Oitenta e seis crianças foram alocadas randomicamente para um de dois grupos: o grupo 1 (40 crianças) recebeu a vacina Hib (conjugada ao toxóide tetânico, PRP-T) liofilizada, reconstituída com a vacina DTP de células inteiras (DTPw) do Instituto Butantan, e o grupo 2 (46 crianças) utilizou a mesma vacina Hib, mas diluída com a DTPw de GSK. As vacinas foram aplicadas aos 2-4-6 meses de idade, concomitantes à vacina oral de poliomielite (VOP), e a vacina de hepatite B de GSK (HB) foi aplicada aos seis meses de idade. Amostras sanguíneas foram coletadas antes da 1ª dose, 2 meses após a 2ª dose, e 1 mês após a 3ª dose. Os eventos adversos foram registrados pelos pais em diários de eventos adversos, durante três dias, e também foram instruídos a

registrar outros eventos adversos não solicitados durante os 30 dias seguintes. Embora os resultados da comparação das soroproteções induzidas pelas duas vacinas tenham sido satisfatórias para todos os antígenos, observou-se um menor título para difteria com a vacina DTPw do I. Butantan. Após retestagem para difteria pelo teste de neutralização em células Vero, estimou-se que a verdadeira taxa de proteção para difteria era de 98% (IC 95% 85;100) no grupo 1, e 100% (IC 95% 85;100) no grupo 2. Para *Haemophilus influenzae* tipo b, tétano e pertússis, foram encontrados 100% de anticorpos protetores com ambas as vacinas. Os eventos adversos foram os esperados para esse tipo de vacina, semelhantes entre os dois grupos, e não houve eventos adversos graves que pudessem ser atribuídos à vacinação. Concluiu-se que ambas as vacinas foram altamente imunogênicas para todos os antígenos, e a resposta protetora ao componente Hib já foi muito elevada após duas doses, dado importante em termos de saúde pública. Esse estudo permitiu a combinação da vacina DTP de células inteiras do Instituto Butantan com a vacina Hib de GSK. O estudo seguinte dá o passo seguinte, a nacionalização completa da vacina tetravalente DTP/Hib, por meio da transferência de tecnologia do componente Hib com GSK.

5.6.2. Martins RM, Camacho LAB, Marcovistz R, Noronha TG, Maia MLS, Santos EM, Barbosa GG, Silva AMV, Souza PCNF, Lemos MCF, Homma A 2008. Immunogenicity, reactogenicity and consistency of production of a Brazilian combined vaccine against diphtheria, tetanus, pertussis and *Haemophilus influenzae* type b. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:711-718.

Instituições envolvidas: Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos/Fiocruz, Escola Nacional de Saúde Pública/Fiocruz e Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro.

Estudo aprovado pela Comissão de Ética da Fundação Oswaldo Cruz, Comissão de Ética da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro, e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

Financiamento: FINEP, Ministério da Ciência e Tecnologia, e Bio-Manguinhos/Fiocruz

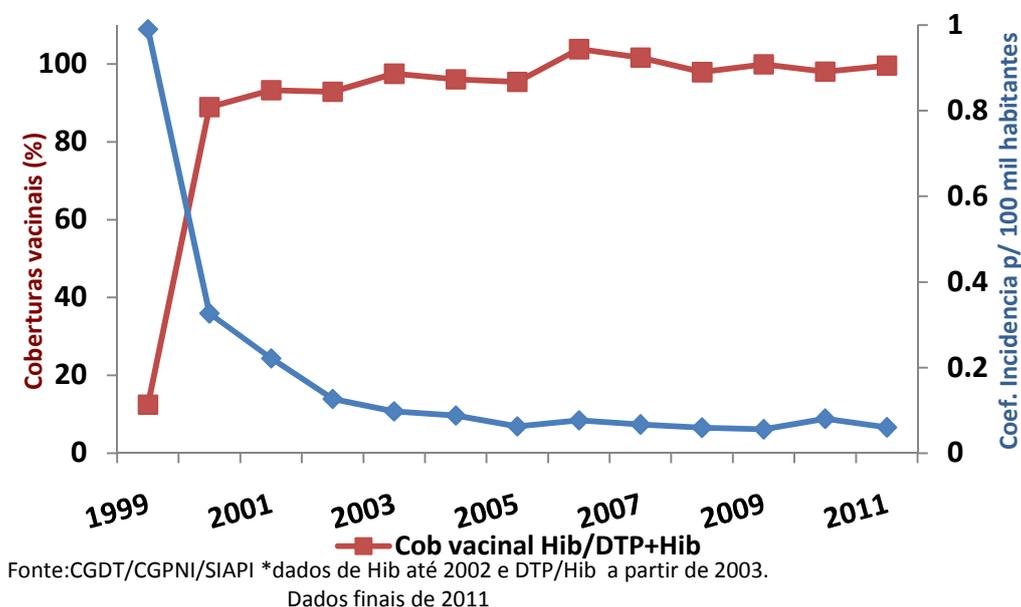
Comentários. No estudo anterior vimos que a vacina Hib havia sido introduzida em sua forma monovalente em 2009, e posteriormente sob a forma de vacina tetravalente DTP/Hib, após estudo mostrando que a diluição da vacina Hib de GSK com a vacina DTPw do Instituto Butantan era imunogênica para todos os componentes e segura. Entretanto, surgiram rumores, após a introdução dessa vacina combinada, que haviam aumentado os eventos adversos, especialmente episódio hipotônico-hiporresponsivo (EHH). Isso motivou a realização de grande estudo, de busca ativa de eventos adversos, envolvendo 21.064 crianças, o qual demonstrou que os eventos adversos após essa vacina tinham uma frequência similar à observada após a vacina DTP (Martins et al. 2007). Esse importante estudo não é resumido aqui, pois se trata de um estudo observacional, fugindo aos nossos critérios estabelecidos de definição de estudo clínico, mas é apresentado na íntegra na segunda parte dessa tese, onde apresento um resumo de minhas contribuições pessoais para o Programa Nacional de Imunizações.

A vacina tetravalente em uso desde 2002 pelo PNI tinha o componente Hib produzido por GSK e distribuído por Bio-Manguinhos. Pelo acordo de transferência de tecnologia, Bio-Manguinhos conseguiu produzir três lotes comerciais da vacina DTP/Hib, com o componente DTP fornecido pelo Instituto Butantan, e o componente

Hib produzido em Bio-Manguinhos. Era preciso realizar um estudo clínico para verificar se a vacina totalmente produzida no Brasil tinha consistência de produção e se era imunogênica e segura. Esse estudo clínico randomizado e duplo-cego incluiu 1.000 crianças, demonstrou a consistência de produção, e mostrou não-inferioridade da vacina DTP/Hib produzida em Bio-Manguinhos em relação à vacina DTP/Hib de GSK. Esse estudo permitiu completar a transferência de tecnologia da vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo b, e a introdução da vacina tetravalente DTP/Hib de Bio-Manguinhos/Butantan na rotina do PNI. Ele é apresentado na íntegra na segunda parte dessa tese.

A introdução da vacina Hib no calendário vacinal de rotina foi em 1999 e a vacina tetravalente foi introduzida em 2002. O impacto no número de casos da doença foi imediato (Figura 34).

Figura 34. Coberturas vacinais da vacina Hib e incidência/100.000 habitantes de meningite por *Haemophilus influenzae* tipo b, por ano. Brasil, 1999-2011 (*)



(*) A linha de retângulos indica as coberturas vacinais e a linha de losangos a incidência da doença

5.6.3. Matos DCS, Silva AMV, Neves PCC, Martins RM, Homma A, Marcovistz R 2009. Pattern of functional antibody activity against *Haemophilus influenzae* type b (Hib) in infants immunized with diphtheria-tetanus-pertussis/Hib Brazilian combination vaccine. *Braz J Med Biol Res* 42:1242-1247.

Instituições envolvidas: Laboratório de Tecnologia Imunológica e Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Estudo aprovado pela Comissão de Ética da Fundação Oswaldo Cruz, Comissão de Ética da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro, e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

Financiamento: FINEP, Ministério da Ciência e Tecnologia, e Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Comentários. Esse estudo é um desdobramento do anterior, investigando a qualidade imunológica da resposta ao poli-ribosil-ribitol-fosfato (PRP). O estudo mostrou que a resposta imunológica foi predominantemente de anticorpos de classe IgG, com uma relação IgG/IgM de 17:1. Além disso, os anticorpos foram predominantemente de classe IgG1, mostrando imunidade com participação tímica, e houve um aumento de avidéz dos anticorpos no decorrer da imunização. Esses resultados ampliaram o conhecimento sobre a resposta imune do componente Hib da vacina DTP/Hib produzida por Bio-Manguinhos, em parceria com o Instituto Butantan (componentes difteria, tétano e coqueluche), após o término do processo de transferência de tecnologia do componente Hib com GlaxoSmithKline.

5.7. Estudo clínico com a vacina tríplice viral

5.7.1. Boaventura AS, Stralioto SM, Siqueira MM, Ranieri TS, Bercini M, Schermann MT, Wagner MB, Silveira TR 2006. Prevalence of antibodies against measles, mumps, and rubella before and after vaccination of school-age children with three different triple combined viral vaccines, Rio Grande do Sul, Brazil, 1996. *Rev Panam Salud Publica* 20:299-306.

Instituições envolvidas: Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN), Setor de Virologia, Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (SES/RS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul; Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Virologia, Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo, Rio de Janeiro; Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul, Centro Estadual de Vigilância e Saúde, Divisão de Vigilância Epidemiológica, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Protocolo aprovado pelo Comitê de Ética Científica e de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e da Universidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

Financiamento: Ministério da Saúde.

Comentários. No contexto dos objetivos de eliminar a rubéola e o sarampo do Brasil e das Américas, era importante saber a segurança e imunogenicidade das diferentes vacinas combinadas contra sarampo, caxumba e rubéola. Os eventos adversos já haviam sido relatados em estudo anterior (Boaventura et al. 2002). O objetivo foi comparar a imunogenicidade de três diferentes vacinas MMR (sarampo/caxumba/rubéola): Tresivac, do Serum Institute of India, MMR-II de Merck-Sharp & Dohme e Trimovax, do Instituto Pasteur-Mérieux. As três vacinas continham o mesmo número de partículas virais por dose: 1.000 TCID₅₀ de vírus do sarampo, 5.000 TCID₅₀ de vírus da caxumba, e 1.000 TCID₅₀ de vírus da rubéola, mas com diferentes cepas. A vacina Tresivac era constituída pelas cepas Edmonston-Zagreb (sarampo), Leningrad-Zagreb (caxumba) e Wistar RA 27/3 (rubéola). A vacina MMR-II era constituída pelas cepas Moraten (sarampo), Jeryl-Lynn (caxumba) e Wistar RA 27/3

(rubéola). A vacina Trimovax era constituída pelas cepas Schwarz (sarampo), Urabe AM-9(caxumba) e Wistar RA 27/3 (rubéola).

Foram incluídas crianças saudáveis de 6 a 12 anos de idade, morando em Porto Alegre e Santa Maria, que frequentavam cinco escolas de Porto Alegre e três de Santa Maria, entre agosto e setembro de 1996. Para sarampo e caxumba foram usados os kits Enzygnost, da Behring, e para rubéola o kit Rubenostika, de Organon. As amostras com resultados negativos ou limítrofes para sarampo e caxumba foram retestadas por neutralização, e no caso de rubéola pelo teste de inibição de hemaglutinação, todos realizados na Fiocruz. Essas crianças já haviam sido vacinadas contra sarampo aos nove meses de idade, e numa vacinação em massa contra sarampo em 1992, mas não haviam sido vacinadas contra caxumba ou rubéola, e portanto a positividade pré-vacinal para caxumba e rubéola deveu-se a exposição natural. Concluiu-se que as três vacinas mostraram boa imunogenicidade para sarampo, caxumba e rubéola, mas a vacina Tresivac, da Serum Institute of India, mostrou uma taxa de soropositividade para caxumba após a vacinação significativamente maior: 99,5% para a vacina Tresivac (cepa Leningrad-Zagreb), 94,5% para a MMR-II (cepa Jeryl-Lynn) e 92% para a Trimovax (cepa Urabe AM-9). Antes das vacinação, os percentuais eram de 69%, 73,5% e 66,2% para cada uma das vacinas, respectivamente.

Uma limitação desse estudo é a vacinação anterior contra sarampo, e a alta exposição antes da vacinação aos vírus selvagens da caxumba e rubéola, que prejudicam a análise de imunogenicidade vacinal. A Tabela original fala em soroconversões, mas seria mais apropriado falar em soropositividade antes e após as vacinações, como aliás está no resumo do artigo. Os resultados sugerem que a vacina Tresivac, do Serum Institute of India, é mais imunogênica para caxumba, e para sarampo e rubéola não há diferenças estatisticamente significativas entre as vacinas. No estudo anterior, de reatogenicidade, a vacina Tresivac foi associada a maior frequência de eventos adversos, comparadas às outras duas. Ainda naquele estudo, os autores comentam que, em 1997, após vacinações em massa, a frequência de meningite asséptica após a vacina Tresivac (cepa Leningrad-Zagreb) foi de 1 caso para 3.390 doses, no Rio Grande do Sul, e com a vacina Trimovax (cepa Urabe-9), foi de 1/14.000 doses, na Bahia.

No caso de vacinas contra caxumba, parece claro que reatogenicidade e imunogenicidade são diretamente proporcionais. Desse modo, os diversos programas de imunização podem escolher as cepas que mais lhes convenham, de acordo com suas condições e preocupações primordiais. A experiência brasileira mostrou, entretanto, que as cepas mais reatogênicas de caxumba não se prestam para campanhas de imunização em massa, devido ao alarme que provocam na população, pelo acúmulo de casos de meningite asséptica em curto espaço de tempo.

5.8. Estudos clínicos com a vacina de rotavírus

5.8.1. Mascarenhas JDP, Linhares AC, Gabbay YB, Leite JPG 2002a. Detection and characterization of rotavírus G and P types from children participating in a rotavirus vaccine trial in Belém, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97:113-117.

Instituições envolvidas: Instituto Evandro Chagas, Funasa, Belém; Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; Coordenação Geral de Laboratórios, Funasa; Conselho Nacional de Pesquisas.

Estudo aprovado pelo Conselho Regional de Medicina do Estado do Pará, Secretaria de Saúde Pública do Estado do Pará, Ministério da Saúde, Comitê de Ética do Instituto Evandro Chagas, do Pará, e Comitê de Revisão Ética da Organização Mundial de Saúde.

Financiamento: Instituto Evandro Chagas – Funasa, Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, Coordenação Geral de Laboratórios, Funasa, e CNPq.

Comentários. As proteínas VP4 e VP7 dos rotavírus induzem anticorpos neutralizantes, e no sistema binário de classificação dos rotavírus, os sorotipos G estão associados com a proteína VP7 e os sorotipos P estão associados com a proteína VP4. A maioria dos isolamentos de casos de diarreia em crianças caem em quatro grupos, dos quais os mais frequentes são P[8],G1 e P[4],G2. O estudo em epígrafe documentou a diversidade de tipos de rotavírus G e P de crianças que participavam de um ensaio clínico utilizando a vacina tetravalente rhesus-humana (RRV-TV) em Belém, Pará. Foi um estudo prospectivo, duplo-cego, randomizado, controlado com placebo, com a duração de dois anos. O grupo experimental de 270 crianças recebeu três doses de RRV-TV e o grupo placebo tinha o mesmo número de participantes. O grupo aqui estudado foi uma subamostra de 83 crianças com gastroenterite, com 90 isolamentos de rotavírus. Os sorotipos G1, G2 e G4 foram detectados em 58,9%, 30% e 4,4% dos casos, respectivamente. G5 foi detectado pela primeira vez em infecções na região Norte, com 4,4% dos casos. Os genótipos predominantes P[8], G1,e P[4],G2, em 53% e 26,6% das infecções, respectivamente. Cepas pouco comuns foram responsáveis por

20,5% das infecções, incluindo P[4],G1; P[6],G1, P[6], G4; P[6], G5; P[8], G2; e P[8], G5. Infecções mistas também foram observadas: P[9+6], G2 e P[8+6],G1. A cepa neonatal P[6] foi associada com diarreia em crianças de 9 a 24 meses de idade. Esse foi o primeiro estudo no Brasil a analisar, em base molecular, genótipos de rotavírus de crianças participando de ensaio clínico. O monitoramento de genótipos de rotavírus circulantes e principalmente dos pacientes com gastroenterite é importante para avaliar a efetividade das vacinas de rotavírus ao longo do tempo. A vacina do estudo em apreço foi suspensa logo após o seu licenciamento por estar associada a um aumento de invaginação intestinal, evento adverso grave. O Brasil adotou, posteriormente, a vacina de rotavírus de GlaxoSmithKline, monovalente, constituída pela cepa humana atenuada de genótipo P[8], G1. Apesar de ser monovalente, é capaz de induzir proteção cruzada contra outros genótipos, mas a emergência de genótipos não protegidos pela vacina é sempre uma possibilidade. Por enquanto, a vacina tem se mostrado efetiva, com impacto na morbidade e hospitalização das crianças por diarreia de todas as causas no Brasil (Carmo et al. 2011), com mínimo aumento de casos de invaginação intestinal após a segunda dose, no Brasil (Patel et al. 2011). Apesar desses benefícios, a vacina de rotavírus é a que tem menor taxa de cobertura do PNI, devido ao seu esquema rígido de aplicação, visando evitar a sua aplicação em idades onde o risco de invaginação é maior. Recentemente, um esquema mais flexível foi adotado, e espera-se que a cobertura aumente, sem aumento do risco de invaginação intestinal. É preciso continuar a monitorar os genótipos circulantes e a efetividade da vacina, por meio de estudos de vigilância pós-comercialização.

5.8.2. Mascarenhas JDP, Leite JPG, Gabbay YB, Freitas RB, Oliveira CS, Monteiro TAF, Linhares AC, 2002b. Rotavirus G serotypes and P[8],G genotypes identified in cases of reinfection among children participating in a trial with rhesus-human reassortant tetravalent vaccine (RRV-TV) in Belém, Brazil. *J Trop Ped* 2002; 48:93-97.

Instituições envolvidas: Instituto Evandro Chagas, Funasa, Belém; Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Embora não informe, esse estudo é um desdobramento do estudo anterior, que foi aprovado pelo Conselho Regional de Medicina do Estado do Pará, Secretaria de Saúde Pública do Estado do Pará, Ministério da Saúde, Comitê de Ética do Instituto Evandro Chagas, do Pará, e Comitê de Revisão Ética da Organização Mundial de Saúde.

Financiamento: OMS, Instituto Evandro Chagas – Funasa, Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, Coordenação Geral de Laboratórios, Funasa, e CNPq.

Comentários. Foram estudados 11 casos de reinfecção por rotavírus envolvendo cinco crianças, dentre 540 crianças que tinham recebido vacinas de rotavírus rhesus-humana ou placebo, e que foram acompanhadas durante dois anos, como referido no estudo anterior. Das cinco crianças com reinfecção, três eram do grupo placebo e duas do grupo vacinal. No grupo placebo, uma criança teve duas reinfecções, com um total de três infecções, por P[8]G1, P[8]G1 e P[4]G2, a segunda delas com diarreia de intensidade muito severa; duas crianças tiveram uma reinfecção cada; a intensidade da diarreia nas reinfecções foi muito severa em um episódio, de moderada a severa em um episódio, e não foi avaliada em dois episódios. No grupo vacinal, houve duas reinfecções, com diarreia de intensidade moderada a severa, e num caso a infecção e a reinfecção foram pelo mesmo genótipo P[8]G1. O estudo mostra que, pelo menos em alguns casos, a reinfecção por rotavírus pode ser muito intensa, pode ser pelo mesmo genótipo, e sublinha a necessidade de maiores estudos sobre a imunidade aos rotavírus, selvagens ou vacinais. Não há informações sobre infecções bacterianas ou parasitárias concomitantes.

5.9. Estudo clínico com a vacina de influenza

5.9.1. Santini-Oliveira M, Camacho LAB, Souza TML, Luz PM, Vasconcellos MTL, Giacoia-Gripp CBW, Morgado MG, Nunes EP, Lemos AS, Ferreira ACG, Moreira RI, Veloso VG, Siqueira MM, Grinsztejn B 2012. H1N1pdm09 adjuvanted vaccination in HIV-infected adults: a randomized trial of two single versus two double doses. *PLoS One* 7:1-11.

Instituições envolvidas: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, Rio de Janeiro; Escola Nacional de Saúde Pública, Fiocruz, Rio de Janeiro; Laboratório de Vírus Respiratórias, NIC-WHO, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro; Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro.

Protocolo aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz. Registrado no Clinical trials network.

Financiamento: Departamento Nacional de DST e Aids/MS e Programa Nacional de Imunizações/MS.

Comentários. Pessoas com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) têm maior risco de doença grave pelo vírus da influenza A pandêmica (H1N1pdm09), e recomendou-se vaciná-las contra a influenza pandêmica para protegê-las. O objetivo do trabalho em apreço foi avaliar a segurança, imunogenicidade e persistência da resposta imune após a vacinação contra a influenza pandêmica A(H1N1pdm09), com uma vacina contendo adjuvante (ASO3, um composto de esqualeno), em adultos de 18-59 anos, não vacinados contra influenza nos últimos três meses. Foi um estudo aberto, randomizado, em que o grupo infectado pelo HIV recebeu dose simples (3,75 µg de hemaglutinina) ou dupla (7,5 de µg de hemaglutinina), em duas doses, com intervalo de 21 dias. O grupo controle recebeu uma dose simples e única da vacina. O desfecho primário foi a soroconversão, avaliada pelo ensaio de inibição da hemaglutinação. Foram incluídos 256 participantes HIV-infectados (randomizados para receber 129 e 127 doses simples ou duplas, respectivamente) e 71 controles HIV-negativos. Entre os participantes infectados pelo

HIV, a soroconversão aumentou de 46,7% e 51,7% após a 1ª dose para 77,2% e 83,8% após a segunda dose da vacina, usando dose simples ou dupla, respectivamente. Os participantes com mais de 40 anos mostraram maior soroconversão do que os mais jovens. A soroconversão entre as mulheres infectadas pelo HIV e aquelas cujo nadir de CD4 era de <200 células/mm³ foi significativamente maior com duas doses. A persistência de anticorpos protetores seis meses após a vacinação foi obtida por 80% e 89,9% dos participantes HIV-infectados que receberam uma e duas doses, respectivamente. Em conclusão, os resultados respaldam a recomendação de usar duas doses de vacina H1N1pdm09 com adjuvante em pessoas HIV-infectadas, para obter anticorpos em níveis mais elevados e de maior duração. Esse é um estudo interessante, muito bem concebido e realizado, e que pode ajudar a planejar as vacinações contra influenza de pessoas HIV-infectadas. O valor imunestimulante do adjuvante ASO3 fica claro. Esse adjuvante foi utilizado em larga escala para vacinação contra influenza e é uma suspensão de óleo em água composto por esqualeno, α -tocoferol e poli-sorbato. Foi associado a raros casos de narcolepsia, nos países do norte da Europa, mas não em outros; tudo indica que há uma associação com predisposição genética (Nohynek et al. 2012). Aqui vemos uma limitação dos estudos clínicos: por melhores que sejam, não permitem avaliar o risco de eventos adversos raros. Para estes últimos são necessários os estudos de farmacovigilância pós-comercialização, como o citado acima. Do ponto de vista metodológico o estudo em epígrafe pode servir de modelo: a metodologia, apresentação dos dados, redação, acesso ao “checklist” CONSORT e ao protocolo, especificação detalhada das contribuições de cada autor, entre outros aspectos.

5.10. Estudos clínicos com a vacina de papiloma

5.10.1. Giuliano AR, Palefsky JM, Goldstone S, Moreira Jr ED, Penny ME, Aranda C, Vardas E, Moi H, Jessen H, Hillman R, Chang Y, Ferris D, Rouleau D, Bryan J, Marshall JB, Vuocolo S, Barra E, Radley D, Haupt RM, Guris D 2011. Efficacy of quadrivalent HPV vaccine against HPV infection and disease in males. *New Eng J Med* 354:401-411.

Instituições envolvidas: Estudo multicêntrico internacional. *Risk Assessment, Detection, and Intervention Program, H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute, Florida, USA; Department of Medicine, University of California, USA; Mount Sinai School of Medicine, NY, USA; Associação Obras Sociais Irmã Dulce e Fundação Oswaldo Cruz/MS, Ba, Brasil; Instituto de Investigación Nutricional, Lima, Peru; University Medical Center, National Public Health Institute, Morelos, Mexico; Ndlela Research and Clinical Trials Unit, Faculty of Health Sciences, Joannesburg, South Africa; Olafia Sexually Transmitted Infections Clinic, Oslo University Hospital, Oslo; Private Clinic for Infectious Diseases, Berlin; STI Research Centre, University of Sydney, Australia; Division of Urology, Department of Surgery, Taipei Veterans General Hospital, Taipei, Taiwan; Medical College of Georgia, Augusta; Centre de Reserche du CHUM, Université de Montreal, Canada; Merck, North Wales, PA, USA.*

Aprovado pelas “Institutional Review Boards” (Comitês de Ética) das instituições participantes.

Registro internacional: Clinical trials.gov NCT00090285.

Financiamento: Merck, *National Center for Research Resources*, e *National Institutes of Health (USA)*.

Comentários. Embora as vacinas contra o papilomavírus tenham como alvo principal a prevenção do câncer do colo uterino, e sua eficácia já esteja demonstrada, as infecções com o papilomavírus (HPV) e as doenças causadas pelo HPV acometem também rapazes e homens adultos. O objetivo primário de eficácia foi mostrar que a vacina quadrivalente contra HPV reduz a incidência de lesões genitais externas

relacionadas aos HPV tipos 6, 11, 16 e 18. Foram incluídos 4.065 rapazes e homens adultos saudáveis de 16 a 26 anos de idade, 2.032 no grupo da vacina e 2.033 no grupo placebo, de 18 países, em um estudo randomizado, duplo-cego, controlado com placebo. Eram heterossexuais 3.463 e 602 tinham relações sexuais com pessoas do mesmo sexo. Desses participantes, 2.805 foram elegíveis para análise por adesão ao protocolo, dos quais 1.397 receberam a vacina HPV quadrivalente e 1.408 receberam placebo. As análises de eficácia foram conduzidas em um grupo por adesão ao protocolo, no qual os participantes receberam todas as três doses de vacina e eram negativos para os tipos de HPV na inclusão, e num grupo de intenção de tratamento, no qual os participantes receberam vacina ou placebo, independentemente de serem portadores ou não do HPV na inclusão. No grupo de intenção de tratamento, foram observadas 36 lesões genitais externas no grupo vacinado e 89 no grupo placebo, com uma eficácia de 69% (IC95% 40,8; 73,8). A eficácia foi de 65,5% (IC 95% 45,8; 78,6) para lesões relacionadas ao HPV-6, 11, 16 e 18. No grupo de adesão ao protocolo, a eficácia contra lesões relacionadas aos HPV-6, 11, 16 e 18 foi de 90,4% (IC 95% 69,2; 98,1). A eficácia relacionada a infecção persistente com HPV-6, 11, 16 e 18 e a detecção de DNA viral em qualquer tempo foi de 47,8% (IC 95% 36,0; 57,6) e 27,1% (IC 95% 16,6; 36,3), respectivamente, no grupo de intenção de tratamento e 85,6% (IC 95% 73,4; 92,9) e 44,7% (IC 95% 31,5; 55,6) no grupo de aderência ao protocolo. Dor no local da injeção foi significativamente mais freqüente entre os participantes que receberam a vacina HPV quadrivalente do que entre os que receberam placebo (57% versus 51%, $p < 0,001$). Concluiu-se que a vacina HPV previne a infecção com HPV-6, 11, 16 e 18 e o desenvolvimento de lesões genitais externas em pessoas do sexo masculino de 16 a 26 anos de idade.

A eficácia da vacina de papiloma quadrivalente em mulheres já foi demonstrada para prevenir neoplasia intraepitelial cervical, vulvar ou vaginal, assim como adenocarcinoma *in situ*, causados pelos tipos vacinais 6, 11, 16 e 18 (Garland et al. 2007; The Future II study group 2007). O estudo em epígrafe avaliou a eficácia da vacina qHPV na prevenção de lesões causadas pelo HPV no sexo masculino. A taxa de infecção anogenital do sexo masculino é igual à do sexo feminino, embora as respostas imunes ao HPV sejam diferentes, 17,9% das mulheres e 7,9% dos homens são positivos sorologicamente para o HPV. Entre as doenças relacionadas ao HPV no homem estão

condilomas acuminados anogenitais, câncer do pênis, ânus e orofaringe. Esse estudo mostrou que é possível evitar essas doenças relacionadas ao HPV em rapazes e jovens do sexo masculino pela vacinação com a vacina HPV quadrivalente.

5.10.2. Moreira Jr ED, Palefsky JM, Giuliano AR, Goldstone S, Aranda C, Jessen H, Hillman RJ, Ferris D, Coutlee F, Vardas E, Marshall JB, Vuocolo S, Haupt RM, Guris D, Garner EIO 2011. Safety and reactogenicity of a quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) L1 viral-like-particle vaccine in older adolescents and young adults. *Human Vaccines* 7:768-775.

Instituições envolvidas: Estudo multicêntrico internacional. Associação Obras Sociais Irmã Dulce e Fundação Oswaldo Cruz/MS, Ba, Brasil; Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, Fiocruz, Ministério da Saúde, Ba; *Department of Medicine, University of California, USA; Risk Assessment, Detection, and Intervention Program, H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute, Florida, USA; Mount Sinai School of Medicine, NY, USA; University Medical Center, National Public Health Institute, Morelos, Mexico; Private Clinic for Infectious Diseases, Berlin; STI Research Centre, University of Sydney, Australia; Medical College of Georgia, Augusta; Centre de Reserche du CHUM, Université de Montreal, Canada; Division of Medical Virology, University of Stellenbosch, South Africa and Lancet Laboratories, Joannesburg, South Africa; Merck, North Wales, PA, USA.*

Aprovado pelas “Institutional Review Boards” (Comitês de Ética) das instituições participantes.

Registro internacional: Clinical trials.gov NCT00090285

Financiamento: Merck, Qiagen, National Institutes of Health (USA).

Comentários. No estudo anterior vimos os resultados de efetividade da vacina HPV quadrivalente (tipos 6, 11, 16, 18) na prevenção de infecções por HPV no sexo masculino. O estudo em epígrafe detalha a reatogenicidade e segurança da vacina quadrivalente HPV (qHPV) no sexo masculino, no mesmo grupo de estudo. A proporção de participantes que relatou pelo menos um evento adverso local foi maior no grupo que recebeu a qHPV do que no grupo placebo (60,1% versus 53,7%, respectivamente). A maioria dos eventos adversos foi de intensidade leve ou moderada. A incidência de pelo menos um evento adverso sistêmico foi comparável entre os grupos vacinal e placebo (31,7% versus 31,4%, respectivamente). Não houve eventos adversos graves ou mortes. A ocorrência de eventos adversos não aumentou

com cada injeção sucessiva, e entre os participantes que eram soropositivos para pelo menos um tipo de HPV contido na vacina o perfil de eventos adversos foi similar ao de toda a coorte. Em conclusão, a vacina HPV quadrivalente foi bem tolerada e teve perfil de segurança favorável em pessoas do sexo masculino de 16 a 26 anos. Esse é um estudo minucioso de eventos adversos após a vacina contra papilomavírus quadrivalente. A reatogenicidade foi muito baixa, e é interessante que houve uma frequência elevada de eventos adversos no grupo placebo, atestando a acurácia com que o estudo foi feito. No registro das temperaturas, não é explicado qual foi a técnica de mensuração, provavelmente foi oral ou retal, pois febre foi definida como temperatura $\geq 37,8^{\circ}\text{C}$. Com esta definição, houve 6% de febre no grupo vacinado e 5,8% no grupo placebo, e a diferença não é estatisticamente significativa. Quatro e três participantes tiveram temperatura entre $39,9^{\circ}\text{C}$ e $40,9^{\circ}\text{C}$, nos grupos vacinal e placebo, respectivamente, e um voluntário em cada grupo teve temperatura $\geq 40,9^{\circ}\text{C}$. Não fosse o grupo placebo, esses eventos seriam atribuídos à vacinação. Tiveram eventos adversos no local da vacinação 59,9% dos participantes no grupo vacinal e 53,6% no grupo placebo, diferença estatisticamente significativa, mas os eventos adversos atribuíveis à vacinação foram, assim, de apenas 6,3%. Esses dados mostram a importância de se dispor de um grupo placebo em estudos desse tipo, mas a legislação brasileira de estudos clínicos dificilmente vai permitir novos estudos com vacina de papiloma utilizando placebo, após a introdução da vacina de papiloma no PNI. A Resolução CFM nº 1.885, de 23 de outubro de 2008 proíbe a realização de estudos com placebo se houver tratamento eficaz (ou vacina) disponível.

5.10.3. Palefsky JM, Giuliano AR, Goldstone S, Moreira Jr ED, Aranda C, Jessen H, Hillman R, Ferris D, Coutlee F, Stoler MH, Marshall JB, Radley D, Vuocolo S, Haupt RM, Guris D, Garner EIO 2011. HPV vaccine against anal HPV infection and anal intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med* 365:1576-1585.

Instituições envolvidas: Estudo multicêntrico internacional. *Department of Medicine, University of California, USA; Risk Assessment, Detection, and Intervention Program, H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute, Florida, USA; Mount Sinai School of Medicine, NY, USA; Associação Obras Sociais Irmã Dulce e Fundação Oswaldo Cruz/MS, Ba, Brasil; STI University Medical Center, National Public Health Institute, Morelos, Mexico; Private Clinic for Infectious Diseases, Berlin; STI Research Centre, University of Sydney, Australia; Medical College of Georgia, USA; Centre de Reserche du CHUM, Université de Montreal, Canada; University of Virginia, USA; Merck & Co. Pennsylvania, USA.*

Aprovado pelas “Institutional Review Boards” (Comitês de Ética) das instituições participantes.

Registro internacional: Clinical trials.gov NCT00090285

Financiamento: Merck, National Institutes of Health (USA). Clinical trials.gov NCT00090285.

Comentários. A taxa de câncer anal está aumentando entre homens e mulheres, especialmente entre homens que fazem sexo com homens. O câncer anal é causado pela infecção com o papilomavírus, primariamente dos tipos 16 ou 18, sendo precedido por neoplasia intraepitelial de alto nível (graus 2 ou 3). Estudou-se a segurança e eficácia da vacina quadrivalente contra papilomavírus (qHPV) para prevenção da neoplasia intraepitelial associada aos papilomavírus tipos 6, 11, 16 e 18, em homens que fazem sexo com homens. O estudo em epígrafe é uma subamostra do grande estudo multicêntrico que vimos resumindo em 5.10.1. e 5.10.2. Foram estudados 602 homens que fazem sexo com homens, de 16 a 26 anos de idade. A eficácia da qHPV contra neoplasia intraepitelial associada com os HPV-6, 11, 16 e 18 foi de 50,3% (IC 95% 25,7; 67,2) no grupo de intenção de tratamento; no grupo de adesão

ao protocolo foi de 77,5% (IC 95% 39,6; 93,3). As eficácias correspondentes contra neoplasia intraepitelial anal associada com o HPV de qualquer tipo foram 25,7% (IC 95% -1,1; 45,6) e 54,9% (IC 95% 8,4; 79,1), respectivamente. As taxas de neoplasia intraepitelial anal por 100 pessoas-anos foram de 17,5 no grupo placebo e 13,0 no grupo vacinal, por intenção de tratamento; por adesão ao protocolo, as taxas foram de 8,9 no grupo placebo e 4,0 no grupo vacinal. As taxas de neoplasia relacionadas à infecção pelos HPV-6, 11, 16 e 18 foram reduzidas em 54,2% (IC 95% 18,0; 75,3) por intenção de tratamento e em 74,9% (IC 95% 8,8; 95,4), por protocolo. Os riscos correspondentes de infecção anal persistente por HPV-6, 11, 16 e 18 foram reduzidos em 59,4% (IC 95% 43,0; 71,4) e 94,9% (IC 95% 80,4; 99,40), respectivamente. Não foram observados eventos adversos graves. Conclui-se que a vacina qHPV reduz as taxas de neoplasia intraepitelial anal, inclusive grau 2 ou 3, entre homens que fazem sexo com homens. A vacina teve um perfil de segurança favorável e pode ajudar a reduzir o risco de câncer anal. Esse estudo indica que a vacina quadrivalente HPV-6, 11, 16, 18 é capaz de reduzir neoplasias em homens que fazem sexo com homens, para quem a vacinação de mulheres poderia não proteger, mesmo levando em conta a proteção de rebanho. Idealmente, a vacinação dos homens que fazem sexo com homens deveria preceder o início da atividade sexual, mas isso vai ser difícil de conseguir.

5.10.4. Hillman RJ, Giuliano AR, Palefsky JM, Goldstone S, Moreira Jr ED, Vardas E, Aranda C, Jessen H, Ferris DG, Coutlee F, Marshall JB, Vuocolo S, Haupt RM, Guris D, Garner EIO 2012. Immunogenicity of the quadrivalent human papillomavirus (type 6/11/16/18) vaccine in males 16 to 26 years old. *Clin Vacc Immunol* 19:261-267.

Instituições envolvidas: Estudo multicêntrico internacional. *STI Research Centre, University of Sydney, Australia; Risk Assessment, Detection, and Intervention Program, H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute, Florida, USA; Department of Medicine, University of California, USA; Mount Sinai School of Medicine, NY, USA; Associação Obras Sociais Irmã Dulce e Fundação Oswaldo Cruz/MS, Ba, Brasil; Division of Medical Virology, University of Stellenbosch, South Africa and Lancet Laboratories, Joannesburg, South Africa; University Medical Center, National Public Health Institute, Morelos, Mexico; J2 Private Clinic for Infectious Diseases, Berlin; Gynecologic Cancer Prevention Center, Georgia Health Sciences University, Georgia, EUA; Centre de Reserche du CHUM, Université de Montreal, Canada; Merck & Co. Pennsylvania, USA.*

Aprovado pelas “Institutional Review Boards” (Comitês de Ética) das instituições participantes.

Registro internacional: Clinical trials.gov NCT00090285.

Financiamento: Merck, Sharp & Dohme.

Comentários. Em 5.10.1., vimos a eficácia da vacina quadrivalente de papilomavírus (qHPV) para evitar a infecção ano-genital e lesões causadas pelos papilomavírus tipos 6, 11, 16 e 18. O estudo em epígrafe avalia a imunogenicidade da qHPV, no mesmo grupo de estudo multicêntrico internacional. Mesma população dos estudos anteriores, coorte total, isto é, 4.065 homens, dos quais 3.463 heterossexuais e 602 homens que fazem sexo com homens. Estudo realizado entre 3 de setembro de 2004 e 29 de agosto de 2008, em 71 sítios de 18 países. Esquema vacinal 0-2-6 meses. As amostras de soro foram coletadas antes da vacinação, e nos meses 7, 24 e 36 após a vacinação. A imunogenicidade foi avaliada com um ensaio Luminex. Quase todos os participantes (97,4%) soroconverteram para os tipos de HPV contidos na vacina no mês 7. No mês 36, 88,9%, 94,0%, 97,9% e 57,0% dos participantes eram ainda

soropositivos para HPV-6, 11, 16 e 18, respectivamente. Para todos os tipos, os participantes de cor negra tiveram títulos de anticorpos significativamente mais elevados no mês 7 do que os caucasianos e asiáticos. Observou-se resposta anamnésica nos homens soropositivos antes da vacinação. A vacina foi altamente imunogênica nos homens de 16 a 23 anos de idade; as respostas de soroconversão foram similares às observadas em mulheres, embora os títulos médios geométricos fossem mais baixos em homens. Não é possível comparar os TMGs em homens e mulheres, pois foram dados obtidos em estudos diferentes, com países e populações diferentes. Não há evidências indicando que estes níveis diferentes de anticorpos tenham relevância clínica. As respostas imunes foram consistentes com a eficácia da vacina na prevenção de infecção pelo HPV incidente e persistente, verrugas anogenitais, e neoplasia intraepitelial anal. Essa série de estudos com a vacina quadrivalente de papiloma é notável pela sua metodologia e realização apuradas, integração internacional de várias instituições, incluindo o Ministério da Saúde, e pode subsidiar futuras ações preventivas contra neoplasias ano-genitais em homens, especialmente para os homens que fazem sexo com homens. Entretanto, ainda há questões a esclarecer, como a duração da imunidade conferida pela vacina. Somente o acompanhamento clínico e soro-epidemiológico em longo prazo permitirá responder a esta e outras questões.

5.11. Estudos clínicos com a vacina de malária

5.11.1. Urdaneta M, Prata A, Struchiner CJ, Tosta CE, Tauil P, Boulos M 1996. Safety evaluation of SPf66 malaria vaccine in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 29:497-501.

Instituições envolvidas: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG; Laboratório de Malária, Núcleo de Medicina Tropical e Nutrição e Departamento de Saúde Coletiva, Universidade de Brasília, DF; Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina e Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Aprovado pela Comissão de Ética das Instituições participantes.

Financiamento: Ministério da Saúde, Organização Pan-Americana de Saúde e Conselho Nacional de Pesquisas.

Comentários. A malária é um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo. A Organização Mundial de Saúde estimou que em 2008 ocorreram 243 milhões de casos de malária no mundo, dos quais quase 90% na África. Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde, cerca de um terço da população do continente americano vive em zonas com risco de transmissão da malária. No continente americano predomina o *Plasmodium vivax*, na África o *Plasmodium falciparum*, que causa doença mais grave. No Brasil, há uma tendência decrescente na incidência de malária e no percentual de casos devidos ao *Plasmodium falciparum*, graças à combinação terapêutica com derivados da artemisina (Suárez-Mutis et al. 2013). Segundo a Secretaria de Vigilância à Saúde do Ministério da Saúde, os bons resultados obtidos nos últimos anos devem-se à expansão da rede de diagnóstico, à detecção e ao tratamento oportuno dos casos, e ao novo esquema terapêutico. Ainda assim, essas ações são trabalhosas, de alto custo, sujeitas a retrocessos, e assim uma vacina contra malária seria muito importante em termos de saúde pública, principalmente para o *Plasmodium falciparum*. Entretanto, o desenvolvimento de vacinas contra malária tem se mostrado um enorme desafio, devido à complexidade antigênica do parasito e sua mutabilidade. Para tentar uma nova abordagem, foi desenvolvida a vacina contra

Plasmodium falciparum SPf66, pelo grupo de pesquisas do Dr. M. E. Patarroyo, do Instituto de Imunologia da Universidade Nacional da Colômbia. Esta vacina é um polímero sintético contendo sequências de três peptídeos de merozoítos e estágios eritrocíticos de *Plasmodium falciparum*, e um peptídeo de proteína de circunsporozoíto, já testada em áreas endêmicas da Colômbia, Equador, Venezuela, Tanzânia e Gâmbia. Esse foi um estudo randomizado, duplo-cego, controlado com placebo. Foram incluídos 800 participantes, de ambos os sexos, de 7 a 60 anos de idade, residentes na municipalidade de Costa Marques, Rondônia. Os participantes receberam três doses de vacina ou placebo. As vacinas continham, além dos antígenos vacinais, hidróxido de alumínio, e o placebo foi o toxóide tetânico, para a 1ª dose, e hidróxido de alumínio, para as doses 2 e 3. O esquema vacinal foi 0, 1 e 6 meses, para a 1ª, 2ª e 3ª doses, respectivamente. Questionários sobre sintomas e identificação de eventos adversos locais foram aplicados duas horas após cada dose, quatro semanas após a 1ª dose, e duas semanas após a 2ª e 3ª dose. Os eventos adversos nos grupos vacinais e placebo foram comparados, por dose.

Os eventos adversos mais comuns foram os locais, em geral leve inflamação acompanhada frequentemente por prurido local, e foram mais freqüentes após a segunda dose. Todos foram de breve duração, desaparecendo em minutos, horas ou alguns dias, exceto os nódulos, que em alguns casos duraram até 15 dias. Os eventos sistêmicos foram mais freqüentes após a 1ª dose. Não foram observados eventos adversos graves. Concluiu-se que a vacina de malária SPf66 foi bem tolerada e sem eventos adversos graves, mas conclusões mais seguras dependeriam de estudos mais amplos.

5.11.2. Urdaneta M, Prata A, Struchiner CJ, Tosta CE, Tauil P, Boulos M 1998.

Evaluation of SPf66 malária vaccine efficacy in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 58:378-385

Instituições envolvidas: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba; Laboratório de Malária, Núcleo de Medicina Tropical e Nutrição e Departamento de Saúde Coletiva, Universidade de Brasília; Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Aprovado pela Comissão de Ética da Universidade de Brasília, Universidade de São Paulo, e Escola de Medicina de Uberaba.

Financiamento: Ministério da Saúde, Organização Pan-Americana de Saúde, e Conselho Nacional de Pesquisas.

Comentários. Mesma população, sítio e vacina do estudo anterior (5.11.1.), avaliado agora para eficácia. Nos estudos anteriores, realizados na América do Sul, África e Ásia, a vacina foi considerada segura e imunogênica, mas os resultados de eficácia foram controversos, com estimativas variando de -9% a 60,2%. O estudo em epígrafe foi randomizado e duplo-cego, realizado em residentes não-imunes de uma área endêmica no Brasil, Costa Marques, Rondonia, entre 1991 e 1993. A taxa de incidência anual de malária era de 500 por 1.000 habitantes, uma das mais altas do país. A região é caracterizada pela distribuição sazonal das infecções por *P. falciparum* e *P. vivax*, com ocupação recente de migrantes provenientes de áreas não-endêmicas. O objetivo do estudo foi avaliar a segurança, imunogenicidade e eficácia da vacina SPf66. Para ter um poder de 80%, com nível de significância de 5%, e estimando perdas de 30%, 358 participantes seriam necessários. Foram incluídos 400 participantes em cada grupo. Nenhum medicamento esquizotocida foi dado antes do início do estudo. A vacina foi aplicada em 3 doses, no esquema 0, 30, 180 dias, na região deltóide, por via subcutânea. Visitas foram marcadas para os dias 0, 30, 45, 90, 180, 195, 240, 300, 360, 450, 540, 630 e 720. Coletas sanguíneas foram realizadas em cada visita. O diagnóstico de malária foi feito por exame microscópico de gota espessa. Tratamento foi realizado imediatamente após o diagnóstico de malária. Caso de malária foi definido como a presença de parasitemia com forma sanguínea assexuada de *P.*

falciparum ou *P. vivax*. Um exame positivo em participante considerado livre de parasitemia nos 30 dias desde uma parasitemia positiva e tratamento adequado foi considerado um caso novo. Não houve evidências de um efeito protetor significativo da vacina de malária SPf66 contra *P. falciparum* e *P. vivax* nesse ensaio clínico. Os autores alertam para cautela na interpretação dos dados, pois a amostra foi calculada para uma eficácia de 80%, e houve perdas consideráveis de *follow up*, resultando em intervalos de confiança muito amplos.

Esse estudo está em sintonia com vários outros que não mostraram eficácia convincente da vacina de malária SPf66. Entretanto, como os autores alertaram, ele foi concebido para avaliar uma eficácia de 80%, e assim não tem poder para **avaliar** uma eficácia mais baixa, e que poderia ser potencialmente útil. Vinte anos depois, continuamos sem contar com uma vacina de malária, mas existe um progresso, embora lento. Um dos maiores desafios é a instabilidade genética do *Plasmodium* ao longo do tempo. Recentemente, a vacina RTS,S/AS02_D, aplicada em 340 lactentes, com *follow up* de 20 meses, na Tanzânia, em estudo de fase II-b, mostrou-se segura e teve uma eficácia contra múltiplos episódios de malária, de 50,7% (IC 95% -6,5;77,1). Essa vacina consiste em sequências de proteína de circunsporozoítos e HBsAg, com o adjuvante AS02_D (emulsão de óleo em água formulada com os imunoestimulantes MPL e QS21). MPL (monofosforil lipídio A) é um imunoestimulante derivado de lipopolissacarídeo detoxificado; QS21 é uma saponina, imunoestimulante, extraída da casca da árvore *Quillaja saponaria*. A vacina conferiu 100% de proteção contra hepatite B, com títulos mais elevados do que o grupo controle, que recebeu vacina de hepatite B em vez da vacina de malária (Abdulla et al. 2013).

Resta saber se será aceita uma vacina contra malária com eficácia bem abaixo dos tradicionais 80-90% ou mais, mas que poderá aliviar a carga da doença em países com elevada endemicidade, e se essa proteção se manterá ao longo do tempo. Um estudo de fase III com essa vacina está em desenvolvimento.

Uma síntese dos estudos e avaliação de perspectivas de vacinas contra malária foi realizada por Carvalho et al. (2013).

5.12. Estudos clínicos com vacinas de *Leishmania*

5.12.1. Mendonça SCF, De Luca PM, Mayrink W, Restom TG, Conceição-Silva F, Da-Cruz AM, Bertho AL, Costa CA, Genaro O, Toledo VPCP, Coutinho SG 1995.

Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 53:195-201.

Instituições envolvidas: Departamento de Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Financiamento: UNDP/World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e Federações de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro e Minas Gerais (FAPERJ e FAPEMIG).

Comentários. As leishmanioses são um grave problema de saúde pública no Brasil e o número de casos vem aumentando progressivamente desde 1984. Acomete todas as regiões do país, mas principalmente as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. O combate ao vetor (flebotomíneos), aos criadouros (lixo) e ao reservatório (cães infectados, em áreas urbanas) são importantes, mas em áreas florestais são ineficazes (Da-Cruz & Pirmez, 2013). O tratamento com antimonial pentavalente é demorado, tóxico, e há formas da doença que são resistentes. O desenvolvimento de uma vacina seria assim altamente desejável. A vacina utilizada nesse estudo, Leishvacin[®], foi desenvolvida por Wilson Mayrink, Professor Titular do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade federal de Minas Gerais, e continha promastigotos de cinco diferentes cepas americanas de *Leishmania*, cada uma delas proveniente de um Estado diferente do Brasil. Foi produzida pelo Laboratório Biobras, de Montes Claros, MG. Foram incluídos 43 indivíduos negativos no teste de Montenegro antes da vacinação. A vacina continha 240 mg de nitrogênio proteico por mL. A vacinação consistiu em duas doses de 1,5 mL, IM, com intervalo de 7 dias. A imunogenicidade foi avaliada pelo teste de Montenegro, e foi investigada a

resposta proliferativa aos antígenos de várias cepas de *Leishmania*. Foram realizados testes de citocinas e caracterizadas as células blásticas reativas a *Leishmania*. Desenvolveram uma resposta positiva pelo teste de Montenegro 74% dos participantes. As respostas proliferativas de monócitos periféricos aos antígenos de *Leishmania* tegumentar foram significativamente maiores após vacinação, comparadas com antes da vacinação, mas frente aos antígenos de *Leishmania chagasi*, que causa a forma visceral da doença, não houve diferenças significativas. Interferon- γ foi detectado nos sobrenadantes de culturas de células estimuladas por antígenos de *Leishmania braziliensis* após a vacinação, mas não antes da vacinação. Um ano após a vacinação, células mononucleares foram obtidas de oito dos indivíduos imunizados e estimulados com antígenos de *L. braziliensis* e em todas as células responsivas eram do fenotipo CD8⁺T, em contraste com um grupo de pacientes com lesões ativas de leishmaniose tegumentar, cujas células reativas ao estímulo com *L. braziliensis* eram principalmente do fenotipo CD4⁺T. Esse estudo indicou que a vacina em experimentação tinha um potencial para proteção contra leishmaniose tegumentar.

5.12.2. Marzochi KBF, Marzochi MCA, Silva AF, Grativol N, Duarte R, Confort EM, Modabber F 1998. Phase 1 study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93:205-212.

Instituições envolvidas: Hospital Evandro Chagas, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; Departamento de Ciências Biológicas, Escola Nacional de Saúde Pública, Fiocruz, Rio de Janeiro; *WHO/TDRHQ*, Geneva.

Estudo aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz.

Financiamento: *UNDP/World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases.*

Comentários. A vacina utilizada nesse estudo, Leishvacin[®], foi desenvolvida por Wilson Mayrink, Professor Titular do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade federal de Minas Gerais, e originalmente continha antígenos de cinco cepas de *Leishmania* (v. 5.12.1.). Devido a dificuldades de padronização, um grupo de trabalho da OMS recomendou a utilização de uma única cepa, *L. amazonensis*, na preparação da vacina (Noazim et al. 2008). O estudo em epígrafe, de fase I, controlado com placebo, utilizou a vacina (Leishvacin[®]) composta somente da cepa *L. amazonensis*, constituída de 50% de formas promastigotas e 50% de material macerado, numa concentração de 1440 mg de nitrogênio proteico por dose, com mertiolate, produzida por Biobras, em condições de BPF. Para o grupo controle foi utilizado placebo, solução de mertiolate ou soro fisiológico. A vacina ou placebo foi aplicada IM, nos dias 0, 7 e 21, em dose única ou em duas doses (aos 0 e 7 dias ou 0 e 21 dias), autoclavada ou não. Foram incluídos 12 participantes por grupo.

Os eventos adversos se resumiram a dor local, mais frequente nos grupos vacinais, porém, entre estes, foi menor no grupo da vacina autoclavada. A imunogenicidade foi avaliada pelo teste de Montenegro, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, mas a soroconversão foi mais frequente e a área de induração maior nos grupos vacinados com dose única ou duas doses com intervalo de 21 dias. Concluiu-se que a vacina não apresenta efeitos colaterais importantes e que pode ser usada em indivíduos saudáveis, mesmo sem

autoclavagem da vacina, na dose de 1440 mg. Atribuiu-se a soroconversão no grupo não vacinado à realização de teste de Montenegro prévio aos procedimentos, o que pode ter sensibilizado os participantes aos antígenos do teste. A dose de 1440 mg de nitrogênio proteico é muito elevada, e levanta preocupações quanto a possíveis eventos adversos.

5.12.3. De Luca PM, Mayrink W, Alves CR, Coutinho SG, Oliveira MP, Bertho AL, Toledo VP, Costa CA, Genaro O, Mendonça CF 1999. Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Vaccine* 17:1179-1185.

Instituições envolvidas: Departamento de Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz; Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Secretaria Municipal de Saúde de Caratinga e Consórcio Intermunicipal de Saúde da Micro-região de Caratinga, Minas Gerais.

Protocolo aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, e Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Financiamento: UNDP/World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Comentários. O estudo teve como objetivo avaliar a imunogenicidade de preparações autoclavadas e não autoclavadas da vacina de *Leishmania* preparada com promastigotos mortos de *Leishmania amazonensis*. Em estudos anteriores, a vacina preparada com cinco cepas de *Leishmania* tinha conferido um certo grau de proteção (50%), com conversão do teste LST (*Leishmania skin test*) de 70%, e foi bem tolerada. Para padronizar melhor o produto vacinal, a vacina passou a ser preparada somente com cepas de *L. amazonensis*. Uma preocupação com vacinas desse tipo, com uma mistura complexa de antígenos, é a estabilidade e imunogenicidade de seus componentes. O estudo em apreço avaliou a imunogenicidade da vacina autoclavada e não autoclavada, mantida durante um ano a 4°C, antes de ser utilizada. A vacina foi produzida por BIOBRAS, em condições de BPF. A vacina autoclavada foi aplicada em 32 participantes e a não autoclavada em 36 participantes, duas doses de 1,5 mL IM com intervalo de 21 dias. Testes imunológicos foram aplicados dois dias antes e 40 dias após a vacinação. O teste LST foi preparado com a mesma cepa da vacina. Somente foram incluídos participantes negativos no teste LST antes da vacinação. As taxas de

conversão induzidas pela vacina autoclavada e não autoclavada foram de 59% e 83%, respectivamente, significativamente diferentes. A resposta proliferativa de células mononucleares periféricas estimuladas por antígenos de *Leishmania* foram significativamente maiores após a vacinação, em comparação com antes da vacinação em ambos os grupos. Células CD8⁺ predominaram sobre células CD4⁺ entre as células reativas a *Leishmania*, em ambos os grupos. A produção de interferon- γ foi significativamente maior após a vacinação, em comparação com a pré-vacinação, no grupo da vacina não autoclavada, mas não no grupo de vacina autoclavada. Esse estudo confirma a imunogenicidade da vacina de *Leishmania* após armazenamento durante um ano a 4°C, mas ela não deve ser autoclavada.

5.12.4. De Luca PM, Mayrink W, Pinto JA, Coutinho SG, Santiago MA, Toledo VP, Costa CA, Genaro O, Reis AB, Mendonça SCF 2001. A randomized double-blind placebo-controlled trial to evaluate the immunogenicity of a candidate vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Acta Trop* 80:251-260.

Instituições envolvidas: Departamento de Imunologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro; Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte; Faculdade de Pediatria, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Realizado em Águas Férreas, Minas Gerais.

Estudo aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz e pelo Ministério da Saúde.

Financiamento: UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Comentários. Esse estudo explora a imunogenicidade da vacina de *Leishmania* preparada com *Leishmania amazonensis*, por BIOBRAS, como descrito anteriormente. Foram estudados oito grupos, em estudo randomizado, duplo-cego, com 10 a 18 participantes por grupo, num total de 120, com idade mediana de 15 anos, todos com teste cutâneo para *Leishmania* (LST) negativos antes da vacinação. Foi utilizado placebo num dos grupos e os demais tinham doses de 180 a 540 µg de N, em duas ou três doses. Os grupos que receberam a vacina converteram o teste LST (89,5%). Nenhum dos participantes que recebeu placebo converteu para LST. Respostas proliferativas e produção de interferon-γ e interleucina 2 foram significativamente maiores após a vacinação do que antes da vacinação em todos os grupos, inclusive os que receberam placebo. A dose de 360 µg foi a que apresentou maior taxa de conversão no teste LST (100%), assim como produção de interferon-γ e interleucina 2 após a vacinação. O estudo indicou que a dose de 360 µg deve ser escolhida, e que três doses não oferecem vantagens sobre duas doses, e essas indicações devem orientar os futuros estudos com essa vacina.

Comentários gerais sobre os estudos com vacina de *Leishmania*. Stockdale & Newton (2013) revisaram 84 estudos controlados que investigaram a eficácia de vários métodos preventivos de leishmaniose. Foram encontrados 11 estudos com vacinas, dos quais 4 mostraram eficácia para controle de casos da doença (diagnosticados por visualização do parasita) e 7 não. Persiste uma série de interrogações sobre essas vacinas e não há marcadores sorológicos ou cutâneos seguros de proteção. Não se sabe se uma conversão no teste LST ou de Montenegro indica proteção contra a doença. Armijos et al. (2004), utilizando uma vacina de *L. amazonensis* com adjuvante de BCG, encontrou uma conversão de 74,4% no grupo vacinado *versus* 14,7% no grupo placebo, mas sem diferença na incidência da doença nos primeiros 12 ou 24 meses após a vacinação. Mesmo com essas e outras interrogações, em vista de alternativas promissoras, os autores da revisão defendem a continuidade dos estudos em busca de uma vacina contra *Leishmania*. Algumas tentativas para melhorar o tratamento estão sendo feitas com imunoterapia associada a tratamento medicamentoso, e outros estudos associam vacinas e outras intervenções profiláticas, mas esses estudos são de difícil avaliação, dada a multiplicidade de intervenções.

5.13. Estudo clínico com a vacina de Necator

5.13.1. Diemert DJ, Pinto AG, Freire J, Jariwala A, Santiago H, Hamilton RG, Periago MV, Loukas A, Tribolet L, Mulvenna J, Correa-Oliveira R, Hotez P, Bethony JM 2012. Generalized urticária induced by the *Na*-ASP-2 hookworm vaccine: Implications for the development of vaccines against helminths. *J Allergy Clin Immunol* 150:169-176.

Instituições envolvidas: *Albert B. Sabin Vaccine Institute, EUA; Department of Microbiology, Immunology and Tropical Medicine, George Washington University, EUA; Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte; Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, EUA; Queensland Institute of Medical Research, Brisbane; Departments of Pediatrics and Molecular Virology and Microbiology, Baylor College of Medicine, Houston.*

Realizado em Americaninhas, Minas Gerais.

Aprovado pelos “Institutional Review Boards” da Fiocruz, *George Washington University Medical Center*, e Ministério da Saúde do Brasil (Anvisa).

Trial registration: Clinicaltrials.gov nº NCT00473967

Financiamento: Instituto de Vacinas Albert B. Sabin, por meio da *Bill e Melinda Gates Foundation*, e da *Johns Hopkins Dermatology, Allergy, and Clinical Immunology Reference Laboratory*.

Comentários. Mais de 500 milhões de pessoas no mundo estão infectadas com ancilostomídeos, predominantemente nas regiões tropicais e pobres. Após a penetração pela pele, as larvas migram através dos tecidos antes de se localizar no intestino, onde os vermes adultos sugam o sangue do indivíduo. As medidas de controle são a higiene, uso de calçados e latrinas, e tratamento em massa com albendazol, medidas de implementação difícil ou de eficácia baixa a curto e médio prazo. Uma vacina de baixo custo, que evitasse as infecções de moderada e alta intensidade, poderia ter um impacto favorável na saúde pública mundial. Foi identificada uma proteína do *Necator americanus*, “Ancylostoma-secreted protein 2” (*Na*-ASP-2), de 21,3 kDa, secretada pelas larvas ao entrarem no hospedeiro. Vacinação

de hamsters e cães com a proteína recombinante ASP-2 reduz a carga infecciosa e a fertilidade do verme. Estudos realizados em populações em áreas de alta endemicidade mostraram que anticorpos anti-ASP-2 estão associados a menor risco de infecções intensas pelo parasito. Por essas razões, a proteína ASP-2 foi escolhida como candidata a antígeno vacinal. Em estudo de fase I em adultos não infectados nos Estados Unidos, a proteína Na-ASP-2 com o adjuvante Alhydrogel (hidróxido de alumínio) foi bem tolerada e imunogênica (Bethony et al. 2008). Assim, decidiu-se realizar um estudo de fase I em adultos morando em área endêmica do Brasil. O estudo foi planejado para incluir 48 participantes adultos e saudáveis, em um dentre 3 coortes. Dentro de cada coorte, o participante foi randomizado para receber ou a vacina Na-ASP-2 ou a vacina de hepatite B, produzida pelo Instituto Butantan, em 3 doses, IM, no deltóide, nos dias 0, 56 e 112. As vacinas tinham 10, 50 ou 100 µg de Na-ASP-2, para a 1ª, 2ª ou 3ª coorte, respectivamente. A vacina de hepatite B foi produzida pelo Instituto Butantan. Após a inclusão de sete participantes com a menor dose da vacina em teste (10 µg) e dois participantes no grupo controle, o estudo foi interrompido, devido a reações urticariformes no grupo em teste. Entre uma e duas horas após a vacinação, três participantes tiveram urticária generalizada, acometendo principalmente a cabeça, pescoço e tronco. Em dois desses casos a urticária foi resolvida em seis horas após a administração de anti-histamínico, e no terceiro o tratamento teve que se estender por dois dias. Além disso, houve intensa hiperemia local em dois participantes, um dos quais teve urticária. O outro teve hiperemia e induração local 13 dias após a vacinação, sem dor, que desapareceu seis dias após o início. Os participantes que receberam a vacina sem terem urticária tinham uma mediana da razão IgG/IgE 85 vezes superior (2.664 versus 31,4, $p = 0,03$) aos que receberam a vacina e tiveram urticária.

Num inquérito sorológico, entre pessoas de área endêmica, de 1 a 85 anos de idade, os níveis de anticorpos IgE contra Na-ASP-2 foram correlacionados com a idade (Pearson $r = 0,15$, $p < 0,001$). Enquanto isso, os níveis de IgE anti- Na-ASP-2 em adultos de área não endêmica são desprezíveis. Em conclusão, a vacina contra ancilostomídeos Na-ASP-2 induziu níveis aumentados de IgE total e específica para o antígeno vacinal que resultou em urticária generalizada. Esses dados avançam o conhecimento para o desenvolvimento de vacinas contra helmintos, devido à sua propensão para

desenvolver respostas fortes de tipo T_H2 . Os dados sublinham ainda as diferenças de respostas imunes entre as infecções naturais por helmintos e ao antígeno recombinante de helminto, bem como entre respostas imunes à vacina *Na*-ASP-2 em áreas não endêmicas e endêmicas.

A obtenção de vacinas eficazes contra helmintos é uma tarefa gigantesca, tendo em vista a sua complexidade estrutural e antigênica. O estudo em apreço avança o conhecimento nessa área e cria um alerta para futuros estudos. Também é importante constatar como a resposta imune ao antígeno vacinal é tão diferente, de acordo com as características da população (americanos *naïve* ou brasileiros de área altamente endêmica para ancilostomídeos).

5.14. Sinopse dos estudos analisados

As Tabelas 2, 3 e 4 permitem uma visão de conjunto e facilitam algumas análises, por exemplo, o número de estudos clínicos por década de publicação e a progressão metodológica, principalmente no que se refere aos delineamentos dos estudos e aos seus aspectos formais éticos, que foram progressivamente sendo incorporados. V. adiante.

Tabela 2. Sinopse dos estudos analisados em ordem sequencial de apresentação

Item	Autor	Título	Revista	Racional (Investigação)	Comentário	Nº participantes/ pessoas
5.1.1	Soper FL & Smith HH	Yellow fever vaccination with cultivated virus and immune and hyperimmune serum	Am J Trop Med Hyg 1938 March; S1-18:111-134.	Investigar o uso da subcepa 17E em seres humanos com soro imune humano, e hiperimune de cabra e de macaco	Participação do Serviço Cooperativo de Febre Amarela do Ministério da Saúde do Brasil e certamente do grupo do Instituto Oswaldo Cruz. Relatos de icterícia	44 adultos com soro humano imune; 16 pessoas com soro imune de cabra 215 pessoas com soro imune de cabra 795 pessoas, com soro imune de macaco
5.1.2	Smith HH, Penna HA, Paoliello A	Yellow fever vaccination with cultured virus (17D) without immune serum.	Am J Trop Med Hyg 1938; 18:437-468.	Estudar a vacinação em larga escala com a subcepa17D	Implementada a produção da vacina de febre amarela no Instituto Oswaldo Cruz	59.532 pessoas a partir de 2 anos de idade

Item	Autor	Título	Revista	Racional (Investigação)	Comentário	Nº participantes/ pessoas
5.1.3.	Fox JP, Manso C, Penna HA, Pará M	Observations on the occurrence of icterus in Brazil following vaccination against yellow fever	Am J Hyg 1942; 36:68-116.	Investigar icterícia pós-vacinal	Recomendação de retirar o soro humano da produção da vacina e de utilizar o sistema de lote-semente	1.072 casos de icterícia pós-vacinal
5.1.4.	Fox JP, Kossobudzki SL, Cunha JF	Field studies on the immune response to 17D yellow fever virus	Am J Hyg 1943; 38:113-138.	Pesquisa visando a escolha de novo lote-semente; dose-resposta; via de administração	Escolha do lote-semente. Ainda se utilizou soro humano com a vacina.	550 homens, BH 918, Pouso Alegre 587, Silvianópolis
5.1.5.	Fox JP, Lennette EH, Manso C, Aguiar JRS	Encephalitis in man following vaccination with 17D yellow fever virus	Am J Hyg 1942; 36:117-142	Investigar surto de encefalite após vacinação com a subcepa 17D-NY 104, preparada em sistema de lote-semente	Suspensão do uso dessa cepa	55.073 (Área de Guanhães) 19.057 (Área de Guaxupé)

Item	Autor	Título	Revista	Racional (Investigação)	Comentário	Nº participantes/ pessoas
5.1.6.	Fox JP, Cabral AS	The duration of immunity following vaccination with the 17D strain of yellow fever virus	Am J Hyg 1943; 37:93-120	Investigar a duração da imunidade após a vacina de febre amarela, de várias subcepas e em diversas faixas etárias	Imunidade persiste após vacinação febre amarela durante 4 anos em adultos. Indicações de menor resposta imune e duração da imunidade em crianças	926 pessoas
5.1.7.	Fox JP et al.	Additional observations on the duration of immunity following vaccination with the 17D strain of yellow fever virus	Am J Hyg 1948; 47:64-70	Investigações adicionais sobre duração da imunidade da vacina de febre amarela	Mais indicações de menor proteção e duração da imunidade em crianças	Aproximadamente 390 pessoas, (Pouso Alegre); 123 pessoas, 4 anos (Varginha)
5.1.8.	Groot H, Ribeiro R B	Neutralizing and haemagglutination- inhibiting antibodies to yellow fever 17 years after vaccination with 17D vaccine	Bull Wld Hlth Org 1962; 27:699-707	Investigar a duração da imunidade a longo prazo (17 anos)	A vacina 17DD protege a longo prazo.	108 adultos

Item	Autor	Título	Revista	Racional (Investigação)	Comentário	Nº participantes/ pessoas
5.1.9.	Lopes OS et al.	Studies on yellow fever vaccine III – dose response in volunteers	J Biol Stand 1988; 16:77-82	Investigar a dose-resposta à vacina de febre amarela	A dose de 1.000 PFU (ou seu equivalente em LD50) é mais do que suficiente para proteger contra febre amarela	300 adultos
5.1.10.	Stefano I et al.	Recent immunization against measles does not interfere with the sero-response to yellow fever vaccine	Vaccine 1999; 17:1042-1046	Investigar a interferência entre vacina de sarampo e vacina de febre amarela	Não há interferência entre a vacina de sarampo e a de febre amarela.	294 crianças de 9 meses de idade
5.1.11.	Freire MS et al.	Seroconversion following vaccination with the 17DD substrain of yellow fever virus	Virus Reviews and Research 2002; 7:51-56.	Investigar a imunidade e duração da imunidade com a vacina 17DD na EP 43	Níveis altos de anticorpos antes da vacinação inibem a resposta imune. Duração da imunidade após 10 anos é questionada.	93 adultos

Item	Autor	Título	Revista	Racional (Investigação)	Comentário	Nº participantes/ pessoas
5.1.12.	Camacho LAB et al.	Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17DD yellow fever vaccines: a randomized trial	Rev Saúde Pública 2004;38:671- 678	Investigar a imunogenicidade de vacina de novo lote- semente comparada com vacina de lote anterior e vacina da OMS, e placebo	Avanços na metodologia e no cumprimento das normas éticas do CNS. O novo lote-semente é eficaz	1.087 adultos
5.1.13.	Camacho LAB et al.	Reactogenicity of yellow fever vaccines in a randomized, placebo-controlled trial	Rev Saúde Pública 2005;39:413- 420.	Reatogenicidade de vacina de novo lote- semente comparada com vacina de lote anterior, vacina da OMS, e placebo	O novo lote-semente é seguro	1.087 adultos
5.1.14	Melo AB et al.	Description of a Prospective 17DD yellow fever vaccine cohort in Recife, Brazil	Am J Trop Med Hyg 2011; 85: 739-747.	Investigar a duração da imunidade	A vacina 17DD protege durante pelo menos 10 anos. Amostragem pequena	238 adultos (prospectivo) 40 adultos (retrospectivo)

Item	Autor	Título	Revista	Racional (Investigação)	Comentário	Nº participantes/ pessoas
5.1.15.	Silva JRN et al.	Mutual interference on the immune response to yellow fever vaccine and a combined vaccine against measles, mumps and rubella	Vaccine 2011; 29:6327-6334	Investigar a Interferência entre a vacina de febre amarela e a tríplice viral aplicadas simultaneamente	Interferência reciprocamente negativa da vacina de febre amarela com os antígenos rubéola e caxumba da vacina tríplice viral	1769 crianças de 12 meses de idade
5.1.16.	Martins RM et al.	17DD yellow fever vaccine. A double blind, randomized clinical trial of immunogenicity and safety on a dose-response study.	Hum Vaccin Immunother. 2013; 9:1-10	Investigar a dose-resposta com a vacina de febre amarela em adultos jovens do sexo masculino	A vacina de febre amarela 17DD é tão imunogênica em doses a partir de 587 UI quanto na dose habitual de 27.476 UI	900 adultos
5.1.17.	Santos AP et al.	Lymphocyte subset analyses in healthy adults vaccinated with yellow fever 17DD virus.	Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100:331-337.	Investigar a resposta imunológica inespecífica e específica após vacina de febre amarela em vacinados e revacinados	A vacina de febre amarela induz resposta imune com ativação e memória dos braços humoral e celular	17 adultos

Item	Autor	Título	Revista	Racional (Investigação)	Comentário	Nº voluntários/ pessoas
5.1.18.	Santos AP et al.	The sample processing time interval as an influential factor in flow cytometry analysis of lymphocyte subsets	Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102: 117-120	Investigar as subpopulações de linfócitos em função do tempo de processamento das amostras	A citometria de fluxo pelo método de lise pode ser feita nos tempos 0, 24 ou 48 horas após a coleta	9 adultos
5.1.19	Martins MA et al.	Activation/modulation of adaptive immunity emerges simultaneously after yellow fever first-time vaccination: is this the key to prevent severe adverse reactions following immunization?	Clin Exp Immunol 2007; 148:90-100	Investigar as subpopulações de linfócitos em 10 adultos sadios primovacinados com a vacina 17DD	A resposta imunológica é complexa, ativação e modulação parecem ocorrer ao mesmo tempo	10 adultos
5.1.20	Santos AP et al.	Detection of T _H 1/ T _H 2 cytokine signatures in yellow fever 17DD first-time vaccinees through ELISpot assay	Cytokine 2008; 42:152-155	Investigar a resposta T _H 1/ T _H 2 em 12 adultos sadios vacinados contra febre amarela.	Após estimulação “ex vivo” de PBMCs com vacina 17DD, IFN- γ e IL-4 aumentam, atingindo níveis máximos 15 dias após vacinação.	12 adultos

Item	Autor	Título	Revista	Racional (Investigação)	Comentário	Nº voluntários/ pessoas
5.1.21	Martins MA et al.	Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination.	Vaccine 2008; 26:1173-1184	Investigar a resposta fenotípica de células da imunidade inata em 10 adultos	Há uma resposta balanceada de ativação e modulação, estudada em neutrófilos, eosinófilos, monócitos, células NK e N	10 voluntários
5.1.22	Neves P CC et al.	TLR expression and NK activation after human yellow fever vaccination.	Vaccine 2009; 27:5543-5549	Investigar a expressão de TLR e ativação de células NK em 8 adultos sadios vacinados contra febre amarela	Células NK são ativadas logo após a vacinação contra febre amarela. Interferon gama elevado no dia 15 após vacinação	8 voluntários
5.1.23	Luiza-Silva M et al.	Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults	Vaccine 2011; 29:583-592	Investigar as fontes celulares de citocinas em 10 voluntários vacinados contra febre amarela	Padrão de ativação e modulação. Produção de interferon gama no dia 7 por células NK, e nos dias 15 e 30 por células T CD4 ⁺	10 voluntários

Item	Autor	Título	Revista	Racional (Investigação)	Comentário	Nº voluntários/ pessoas
5.1.24	Luiza-Silva M et al.	Cytokines signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody	J Infect Dis 2011; 204:873-883	Investigar as citocinas em crianças de 9 a 43 meses de idade, vacinadas contra febre amarela	Citocinas proinflamatórias nos SCs à VFA, e nos não SCs reguladoras. Nos não SCs, revacinados 1 ano após, SC com citocinas proinflamatórias	60 crianças de 9 a 43 meses de idade
5.1.25	Campi-Azevedo et al.	17DD and 17D-213/77 yellow fever substrains trigger a balanced cytokine profile in primary vaccinated children	PLoS one 2012; 7:1-11	Investigar o perfil de citocinas entre 80 crianças de 9 a 12 meses de idade, vacinadas com a vacina 17DD ou 17D-213/77	A vacina de referência da OMS tem um padrão de resposta imunológica semelhante à vacina 17DD de Bio-Manguinhos	80 crianças de 9 a 12 meses de idade
5.1.26	Melo AB et al.	T-cell memory responses elicited by yellow fever vaccine are targeted to overlapping epitopes containing multiple HLA-I and -II binding motifs	PLoS Neglected Tropical Diseases 2013;7:1-11	Memória após a vacina de FA. Sangue coletado antes e 2 meses a 4 anos após a vacinação	Antígenos de vírus vacinais da FA promíscuos podem ser melhores imunógenos	220 adultos

Item	Autor	Título	Revista	Racional (Investigação)	Comentário	Nº voluntários/ pessoas
5.2.1.	Schatzmayr HG et al.	Serological response to measles vaccine (Schwarz strain) in a low-income population at Rio de Janeiro	Rev Microbiol São Paulo 1982; 13 (3):242-243	Estudar a soroconversão à vacina de sarampo, por idade, em população de baixo nível sócio-econômico	Respaldou o início da vacinação contra sarampo aos nove meses de idade	403 crianças de 7 a 25 meses de idade
5.2.2.	Oliva OP et al.	Vacina CAM-70 contra o sarampo, produzida no Brasil. Avaliações de campo em crianças com 6-12 meses de idade	Boletim Epidemiológico, MS, Fundação SESP, 1986; ano XVIII nº 21/26, p. 121-9.	Investigar a resposta imune em 341 crianças de 6 a 12 meses de idade vacinadas com vacina de sarampo CAM-70	A vacina CAM-70 soroconverteu por neutralização 100% das crianças com ≥ 9 meses de idade	341 crianças de 6 a 12 meses de idade
5.2.3	Camacho LAB et al.	Estudo de soroconversão com formulações da vacina Biken CAM-70 contra sarampo	Rev Saúde Pública 2000; 34:358-366	Investigar a dose-resposta com a vacina CAM-70 em crianças, 3 grupos, com 5.000, 1.000 e 200 CCID ₅₀	O grupo de maior dose (5.000 CCID ₅₀) teve melhor resposta imunológica: 82% de SC	223 crianças de 9 a 18 meses de idade

Item	Autor	Título	Revista	Racional (Investigação)	Comentário	Nº voluntários/ pessoas
5.2.4.	Lindgren-Alves CR et al.	Pesquisa de anticorpos contra o sarampo em crianças infectadas pelo HIV, após imunização básica.	Jornal de Pediatria 2001; 77:496-502	Investigar a resposta imune com a vacina CAM-70 em 50 crianças, das quais 21 infectadas perinatalmente pelo HIV	A resposta imune à vacina contra sarampo é mais baixa em crianças infectadas no período perinatal, inclusive após duas doses	50 crianças de 3,5 anos a 5 anos
5.3.1.	Schatzmayr HG, Homma A	Avaliação sorológica da vacina oral, tipo Sabin, contra a poliomielite, em região semi-rural: I. Formação de anticorpos em vacinados	Rev Soc Bras Med Trop 1969; 3:317-322	Investigar a resposta imune à VOP em 114 crianças de 3 meses a 3 anos, zona semi-rural do Rio de Janeiro, 3 doses de VOP	A soroconversão para os tipos 1 e 3 não foi satisfatória; a dose do tipo 1 deve ser aumentada	114 crianças de 3 meses a 3 anos de idade
5.3.2.	Schatzmayr HG et al.	Serological evaluation of poliomyelitis oral and inactivated vaccines in an urban low-income population at Rio de Janeiro, Brazil	Vaccine 1986; 4:111-113	Comparar a resposta imune entre VOP e VIP em 155 crianças aos 2-4-6 meses de idade	A VIP induz mais anticorpos séricos, especialmente para o tipo 3	160 crianças de 2 meses de idade

Item	Autor	Título	Revista	Racional (Investigação)	Comentário	Nº voluntários/ pessoas
5.3.3.	Patriarca PA et al.	Randomised trial of alternative formulations of oral poliovaccine in Brazil	Lancet 1988; 27:429-432	Resposta imune à TVOP com maior dose do tipo 3, comparada com a formulação anterior	A TVOP é mais imunogênica para o tipo 3 com o dobro de partículas do tipo 3 (600.000), em relação ao padrão anterior	441 crianças de menos de 5 anos de idade
5.4.1.	Camacho & Klein	Risco de infecção tuberculosa entre escolares com alta cobertura pelo BCG	Bol Of Sanit Panam 1990; 108:100-112	Usar o BCG e PPD como meio de avaliar prevalência de infecção tuberculosa	A prevalência de infecção tuberculosa em áreas do Rio de Janeiro foi de 4,13%	1721 escolares de seis a dez anos de idade
5.4.2.	Barbosa T et al.	BCG (Bacille of Calmette-Guérin) revaccination leads to improved in vitro IFN- γ response to mycobacterial antigen independent of tuberculin sensitization in Brazilian school-age children	Vaccine 2003; 21:2152-2160	Investigar a resposta imune de citocinas após revacinação BCG em escolares	A produção de interferon gama aumenta após revacinação BCG e pode ser um marcador de proteção contra tuberculose	136 crianças em idade escolar

Item	Autor	Título	Revista	Racional (Investigação)	Comentário	Nº voluntários/ pessoas
5.4.3	Oliveira ES et al.	Interferon-gamma Production by mononuclear cells in Bacille Calmette-Guérin-revaccinated healthy volunteers predicted long-term antimycobacterial responses in a randomized controlled trial	Vaccine 2013; 31:3778-3782	Investigar a produção de IFN- γ após revacinação BCG.	Aumento de 3,3 X ou mais de IFN- γ após revacinação BCG e estímulo com antígenos micobacterianos mantêm maiores respostas após 1 ano.	75 adultos
5.5.1.	Motta MSF et al.	Immunogenicity of hepatitis B vaccine in preterm and full term infants vaccinated within the first week of life	Vaccine 2002; 20:1557-1562	Comparar a imunogenicidade da vacina HB em recém-nascidos pré-termo e a termo	Recém-nascidos pré-termo precisam de uma dose adicional da vacina de hepatite B	110 recém-nascidos, 57 a termo e 53 pré-termo
5.5.2.	Martins RM et al.	Multicenter study on the immunogenicity and safety of two recombinant vaccines against hepatitis B	Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99:865-871	Segurança e resposta imune à vacina recombinante HB do Instituto Butantan	A vacina HB do Instituto Butantan é equivalente à Engerix B de GSK em crianças, e inferior mas aceitável para uso em RNs, adolescentes e adultos jovens	3.937 recém-nascidos, crianças, adolescentes e adultos

Item	Autor	Título	Revista	Racional (Investigação)	Comentário	Nº voluntários/ pessoas
5.5.3.	Luna EJ et al.	Efficacy and safety of the Brazilian vaccine against Hepatitis B in newborns	Rev Saúde Pública 2009; 43:1-6	Investigar a segurança e resposta imune de recém-nascidos à vacina HB do Instituto Butantan	A vacina de hepatite B do Instituto Butantan é equivalente à vacina Engerix B de GSK em recém-nascidos	538 recém-nascidos
5.5.4.	Moraes JC et al.	Immunogenicity of the Brazilian hepatitis B vaccine in adults	Rev Saúde Pública 2010; 44:1-5	Investigar a segurança e resposta imune à vacina HB do Instituto Butantan	A vacina hepatite B do Instituto Butantan é equivalente à vacina Engerix B de GSK em adultos de 31-40 anos	419 adultos de 31 a 40 anos
5.5.5.	Potsch DV et al.	High rates of serological response to a modified hepatitis B vaccination schedule in HIV-infected adults subjects	Vaccine 2010; 28:1447-1450	Investigar a resposta imune à vacina HB em adultos infectados pelo HIV, com o dobro da dose e esquema de 4 doses	A resposta imune à vacina HB é satisfatória com o novo esquema	47 adultos, de 21 a 58 anos, HIV+
5.5.6.	Motta-Castro ARC	Compliance with and response to hepatitis B vaccination in remaining quilombo communities in Central Brazil	Cad Saude Pública 2009; 25:738-742	Aderência à vacinação e resposta imune à vacinação HB em população quilombola	Aderência baixa e resposta imune menor no sexo masculino e pessoas ≥ 40 anos	708 participantes, de 8 comunidades, de 2 a 95 anos de idade

Item	Autor	Título	Revista	Racional (Investigação)	Comentário	Nº voluntários/ pessoas
5.5.7.	Potsch DV et al.	Vaccination against hepatitis B with 4-double doses increases response rates and antibodies titers in HIV-infected adults.	Vaccine 2012;30:5973-5977	Investigar a resposta imune à vacina HB em adultos infectados pelo HIV, com o dobro da dose e esquema de 4 doses	A resposta imune à vacina HB é satisfatória com o novo esquema	163 adultos, HIV+, mediana de idade 37 anos
5.6.1.	Clemens SA et al.	Feasibility study of the immunogenicity and safety of a novel DTPw/Hib (PRP-T) Brazilian combination compared to a licensed vaccine in healthy children at 2, 4, and 6 months of age	Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36:321-330	Investigar se era possível misturar a vacina Hib conjugada, liofilizada, de GSK, com a vacina DTPw do I. Butantan	A vacina Hib conjugada, liofilizada, de GSK, pode ser misturada com a vacina DTPw do I. Butantan	108 lactentes
5.6.2.	Martins RM et al.	Immunogenicity, reactogenicity and consistency of production of a Brazilian combined vaccine against diphtheria, tetanus, pertussis and <i>Haemophilus influenzae</i> type b	Mem Inst Oswaldo Cruz 2008; 103:711-718	Consistência de produção e não inferioridade da vacina DTP/Hib de Bio-Manguinhos-Butantan em relação à vacina DTP/Hib com Hib de GSK	Houve consistência de produção e a vacina DTP/Hib de Bio-Manguinhos – Butantan é não-inferior à vacina DTP/Hib com Hib de GSK	1.000 lactentes

Item	Autor	Título	Revista	Racional (Investigação)	Comentário	Nº voluntários/ pessoas
5.6.3.	Matos DCS et al.	Pattern of functional antibody activity against <i>Haemophilus influenzae</i> type b (Hib) in infants immunized with diphtheria-tetanus-pertussis/Hib Brazilian combination vaccine	<i>Braz J Med Biol Res</i> 42:1242-1247	Avaliação funcional da resposta imune ao PRP da vacina DTP/Hib	A resposta imune é predominantemente IgG1 e a avidéz ao PRP aumenta no decorrer da vacinação	1.000 lactentes
5.7.1.	Boaventura AS et al.	Prevalence of antibodies against measles, mumps, and rubella before and after vaccination of school-age children with three different triple combined viral vaccines, RGSul, Brazil	Rev Panam Salud Publica 2006;20 :299-306	Comparar a resposta imune de 3 diferentes vacinas MMR em escolares do RGSul	Resposta imune satisfatória para as 3 vacinas, mas o componente caxumba da cepa L-Z parece mais imunogênico.	636 crianças de 6 a 12 anos
5.8.1.	Mascarenhas JDP et al.	Detection and characterization of rotavirus G and P types from children participating in a rotavirus vaccine trial in Belém, Brazil	Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97:113-117	Ocorrência de genótipos de rotavírus durante estudo clínico com a vacina rhesus-humana	Muitos genótipos causando infecções. P[8], G1,e P[4],G2, encontrados em 53% e 26,6% das infecções.	83 crianças durante 2 anos

Item	Autor	Título	Revista	Racional (Investigação)	Comentário	Nº voluntários/ pessoas
5.8.2.	Mascarenhas JDP et al.	Rotavirus G serotypes and P[],G genotypes identified in cases of reinfection among children participating in a trial with rhesus-human reassortant tetravalent vaccine (RRV-TV) in Belém, Brazil	J Trop Ped 2002; 48:93-97	Estuda reinfecções por rotavírus em crianças vacinadas com vacina rhesus-humana	Essas reinfecções ocorrem e podem ser de intensidade severa	540 crianças
5.9.1.	Santini-Oliveira M et al.	H1N1pdm09 adjuvanted vaccination in HIV-infected adults: a randomized trial of two single versus two double doses	PLoS One 2012; 7:1-11	Resposta imune de HIV-infectados a 2 doses de vacina H1N1 com adjuvante, com dose simples ou dobrada	Pessoas infectadas pelo HIV respondem melhor a duas doses de vacina com adjuvante e com o dobro da dose	256 adultos HIV positivos e 71 controles
5.10.1.	Giuliano AR et al.	Efficacy of quadrivalent HPV vaccine against HPV infection and disease in males	New Eng J Med 2011; 354:401-411	Prevenção de infecção e lesões ano-genitais causadas pelos tipos vacinais em homens heterossexuais e que fazem sexo com homens	A vacina qHPV é eficaz na prevenção de infecções e lesões genitais em homens heterossexuais e que fazem sexo com homens de 16 a 26 anos	4.065 pessoas do sexo masculino de 16 a 26 anos

Item	Autor	Título	Revista	Racional (Investigação)	Comentário	Nº voluntários/ pessoas
5.10.2.	Moreira Jr ED et al.	Safety and reactogenicity of a quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) L1 viral-like-particle vaccine in older adolescents and young adults	Human Vaccines 2011; 7:768-775	Segurança e eventos adversos na mesma população do estudo anterior	A vacina qHPV apresenta reatogenicidade muito baixa e é segura	4.065 pessoas do sexo masculino de 16 a 26 anos
5.10.3.	Palefsky JM et al.	HPV vaccine against anal HPV infection and anal intraepithelial neoplasia	N Engl J Med 2011; 365:1576-1585	Eficácia da vacina qHPV contra neoplasia anal intraepitelial em homens que fazem sexo com homens	A vacina qHPV reduz as taxas de neoplasia intraepitelial anal, em homens que fazem sexo com homens	602 homens saudáveis que fazem sexo com homens, de 16 a 26 anos
5.10.4.	Hillman RJ et al.	Immunogenicity of the quadrivalent human papillomavirus (type 6/11/16/18) vaccine in males 16 to 26 years old	Clin Vacc Immunol 2012; 19:261-267	Resposta imune da vacina qHPV na mesma população do estudo 5.10.1	A vacina qHPV induz respostas imunes em 97,4% dos homens	4.065 pessoas do sexo masculino de 16 a 26 anos
5.11.1.	Urdaneta M et al.	Safety evaluation of SPf66 malaria vaccine in Brazil	Rev Soc Bras Med Trop 1996; 29:497-501	Investigar eventos adversos após a vacina SPf66 no Brasil	A vacina SPf66 é segura	800, de 7 a 60 anos

Item	Autor	Título	Revista	Racional (Investigação)	Comentário	Nº voluntários/ pessoas
5.11.2.	Urdaneta M et al.	Evaluation of SPf66 malaria vaccine efficacy in Brazil	Am J Trop Med Hyg 1998; 58:378-385	Investigar a eficácia da vacina de malária SPf66 em área endêmica	Não houve evidências de um efeito protetor significativo da vacina de malária SPf66 contra <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i>	572, de 7 a 60 anos
5.12.1.	Mendonça SCF et al.	Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against American tegumentary leishmaniasis	Am J Trop Med Hyg 53:195-201	Investigar a imunogenicidade de vacina de <i>Leishmania</i> pentavalente na dose de 360 µg, duas doses com intervalo de 7 dias	74% dos voluntários tornaram-se positivos no teste de Montenegro após a vacina; imunidade celular apenas para a forma tegumentar	43 adultos de ambos os sexos negativos no teste de Montenegro antes da vacinação
5.12.2.	Marzochi KBF et al.	Phase 1 study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil	Mem Inst Oswaldo Cruz 93:205-212	Investigar a imunogenicidade e segurança de vacina de <i>Leishmania</i> monovalente em dose de 1440 mg em 1 ou 2 doses	Área de induração no teste de Montenegro foi maior nos grupos vacinais do que no grupo placebo; vacina segura	61 adultos masculinos negativos no teste de Montenegro antes da vacinação

Item	Autor	Título	Revista	Racional (Investigação)	Comentário	Nº voluntários/ pessoas
5.12.3.	De Luca PM	Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis	Vaccine 17:1179-1185	Comparar a imunogenicidade de vacina de <i>Leishmania</i> monovalente autoclavada e não autoclavada	A conversão, avaliada pelo teste cutâneo LST foi maior no grupo não autoclavado do que no grupo autoclavado	68 adultos, de ambos os sexos, negativos ao teste LST antes da vacinação
5.12.4.	De Luca PM	A randomized double-blind placebo-controlled trial to evaluate the immunogenicity of a candidate vaccine against American tegumentary leishmaniasis	Acta Trop 80:251-260	Estudar imunogenicidade de vacina monovalente de <i>Leishmania</i> em doses de 180, 360 e 540 µg em 2 ou 3 doses	A conversão, pelo teste LST, foi de 89,5% nos grupos vacinais e 0% no grupo placebo. Maior imunogenicidade do grupo com 360 µg, duas doses são suficientes	120, de 13 a 51 anos, de ambos os sexos, negativos ao teste LST antes da vacinação
5.13.1.	Diemert DJ et al.	Generalized urticaria induced by the <i>Na</i> -ASP-2 hookworm vaccine: Implications for the development of vaccines against helminths	J Allergy Clin Immunol 2012; 150:169-176	Investigar a segurança e respostas imunes à vacina contra <i>Necator Na</i> -ASP-2	A vacina contra <i>Necator Na</i> -ASP-2 induziu reações alérgicas em área endêmica e o estudo foi interrompido	9 adultos

Tabela 3. Número de estudos clínicos por tipo de vacina

Vacinas virais	Nº de estudos	Licenciadas para uso
Febre amarela	26	Todas
Hepatite B	7	
Papilomavírus, quadrivalente	4	
Poliomielite, oral	3	
Sarampo	4	
Sarampo/caxumba/rubéola	1	
Rotavírus	2	
Influenza	1	
Total vacinas virais	48	
Vacinas bacterianas	Nº de estudos	Licenciadas para uso
BCG	3	Todas
DTP/Hib (tetraivalente)	3	
Total vacinas bacterianas	6	
Vacinas parasitárias	Nº de estudos	Licenciadas para uso
Leishmania	4	Nenhuma
Malaria	2	
Necator	1	
Total vacinas parasitárias	7	
Total de estudos	Nº de estudos	Licenciadas para uso
	61	54/61 = 88,5%

Tabela 4. Sinopse dos estudos analisados em ordem cronológica

S = Sim; N = Não ou não informado; NA = Não se aplica

N	Item	Autor (Nº autores, Nº Instituições)	Ano	Comissão Ética	Consenti- mento	Registro Internacional	Rando- mizado	Duplo cego	Simples cego	Cálculo amostral	Critérios de inclusão	Uso de placebo	Informa- ções de suporte*	Declaração de conflitos de inte- resse	Informa- ções s/ Financia- mento
1	5.1.1	Soper (2, 2)	1938	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	5.1.2	Smith (3, 2)	1938	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	5.1.3.	Fox (4, 2)	1942	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	5.1.5.	Fox (4, 2)	1942	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5	5.1.4.	Fox (3, 2)	1943	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6	5.1.6.	Fox (2, 2)	1943	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
7	5.1.7.	Fox (3, 2)	1948	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8	5.1.8.	Groot (2, 3)	1962	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S
9	5.3.1.	Schatzmayr (2, 1)	1969	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10	5.2.1.	Schatzmayr (7, 1)	1982	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11	5.2.2.	Oliva (5, 5)	1986	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
12	5.3.2.	Schatzmayr (4, 2)	1986	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
13	5.3.3.	Patriarca (8, 4)	1988	N	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
14	5.1.9	Lopes (3, 3)	1988	N	?	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S

N	Item	Autor (Nº autores, Nº Instituições)	Ano	Comissão Ética	Consenti- mento	Registro Internaci- onal	Rando- mizado	Duplo cego	Simple cego	Cálculo amostral	Crítérios de inclusão	Uso de placebo	Informa- ções de suporte*	Declaração de conflitos deinte- resse	Informa- ções s/ Financia- mento
15	5.4.1.	Camacho (2, 3)	1990	N	S	N	N	N	N	S	S	N	N	N	S
16	5.12.1	Mendonça (11, 2)	1995	N	N	N	N	N	NA	N	S	N	N	N	S
17	5.11.1	Urdaneta (6, 4)	1996	S	S	N	S	S	NA	S	S	N	N	N	S
18	5.11.2	Urdaneta (6, 4)	1998	S	S	N	S	S	NA	S	S	S	N	S	S
19	5.12.2	Marzochi (7, 3)	1998	S	S	N	S	S	NA	N	S	S	N	N	S
20	5.12.3	De Luca (10, 4)	1999	S	S	N	N	N	NA	N	S	N	N	N	S
21	5.1.10	Stefano (13, 4)	1999	N	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
22	5.2.3	Camacho (5, 1)	2000	N	S	N	S	S	NA	S	S	N	N	N	S
23	5.12.4	De Luca (10, 3)	2001	S	S	N	S	S	NA	N	S	S	N	N	S
24	5.2.4	Lindgren (8, 4)	2001	S	S	N	N	N	S	N	S	N	N	N	S
25	5.8.1	Mascarenh (4,4)	2002	S	S	N	S	S	NA	N	S	S	N	N	S
26	5.8.2.	Mascarenh (7, 2)	2002	S	S	N	S	S	NA	N	S	S	N	N	S
27	5.1.11	Freire (7, 1)	2002	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
28	5.5.1	Motta MSF (5, 2)	2002	S	S	N	N	N	N	S	S	N	N	N	S
29	5.4.2	Barbosa (10, 5)	2003	N	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	S

N	Item	Autor (Nº autores, Nº Instituições)	Ano	Comissão Ética	Consenti- mento	Registro Internacional	Rando- Mizado	Duplo cego	Simple cego	Cálculo amostral	Crítérios de inclusão	Uso de placebo	Informa- ções de suporte*	Declaração de conflitos deinte- resse	Informa- ções s/ Financia- mento
30	5.6.1	Clemens (3, 3)	2003	S	S	N	S	S	NA	N	S	N	N	N	S
31	5.1.12	Camacho (8, 3)	2004	S	S	N	S	S	NA	S	S	S	N	S	S
32	5.5.2	Martins (7, 6)	2004	S	S	N	N	S	NA	S	S	N	N	N	S
33	5.1.13	Camacho (8, 3)	2005	S	S	N	S	S	NA	S	S	S	N	S	S
34	5.1.17	Santos (5, 2)	2005	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
35	5.7.1	Boaventura (8, 4)	2006	S	S	N	S	S	NA	S	S	N	N	N	S
36	5.1.18	Santos (4, 2)	2007	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
37	5.1.19	Martins (11, 5)	2007	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
38	5.1.20	Santos (5, 2)	2008	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
39	5.1.21	Martins (10, 4)	2008	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
40	5.6.2.	Martins (11, 3)	2008	S	S	N	S	S	NA	S	S	N	N	N	S
41	5.1.22	Neves (4, 1)	2009	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
42	5.5.3	Luna (4, 3)	2009	S	S	N	S	S	NA	S	S	N	N	N	S
43	5.5.6	Motta-C (6, 4)	2009	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S
44	5.6.3.	Matos DCS (6, 2)	2009	S	S	N	S	S	NA	S	S	N	N	N	S

N	Item	Autor (Nº autores, Nº Instituições)	Ano	Comissão Ética	Consenti- mento	Registro Internacional	Rando- mizado	Duplo cego	Simple cego	Cálculo amostral	Crítérios de inclusão	Uso de placebo	Informa- ções de suporte*	Declaração de conflitos deinte- resse	Informa- ções s/ Financia- mento
45	5.5.4	Moraes (3, 3)	2010	S	S	N	S	N	S	S	S	N	N	N	S
46	5.5.5	Potsch (11, 4)	2010	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
47	5.1.14	Melo (9, 4)	2011	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	S
48	5.1.15	Silva (9, 4)	2011	S	S	S	S	S	NA	S	S	N	N	S	S
49	5.1.23	Luiza-S. (11, 5)	2011	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	S
50	5.1.24	Luiza-S. (19, 8)	2011	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	S	S
51	5.10.1	Giuliano (20, 15)	2011	S	S	S	S	S	NA	S	S	S	N	S	S
52	5.10.2	Moreira (15, 13)	2011	S	S	S	S	S	NA	S	S	S	N	S	S
53	5.10.3	Palefsky (16, 11)	2011	S	S	S	S	S	NA	S	S	S	N	S	S
54	5.1.25	Campi-A.(21, 8)	2012	S	S	S	S	S	NA	N	S	N	N	S	S
55	5.5.7	Potsch (10, 3)	2012	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
56	5.9.1	Santini (14, 3)	2012	S	S	S	S	N	N	N	S	N	S	S	S
57	5.10.4	Hillman (15, 11)	2012	S	S	S	S	S	NA	S	S	S	N	S	S
58	5.13.1	Diemert (13, 6)	2012	S	S	S	S	S	NA	N	S	S	N	S	S
59	5.4.3	Oliveira (3, 4)	2013	S	S	N	S	N	N	N	S	N	S	S	S
60	5.1.16	Martins (17, 4)	2013	S	S	S	S	S	NA	S	S	N	N	S	S

N	Item	Autor (Nº autores, Nº Instituições)	Ano	Comissão Ética	Consenti- mento	Registro Internacional	Rando- mizado	Duplo cego	Simples cego	Cálculo amostral	Critérios de inclusão	Uso de placebo	Informa- ções de suporte*	Declaração de conflitos deinte- resse	Informa- ções s/ Financia- mento
61	5.1.26	Melo (10, 6)	2013	S	S	N	N	N	N	N	S	N	S	S	S

*Informações de suporte: Informações sobre “Checklist” CONSORT, Protocolo de estudo, dados suplementares *online*, etc.

As informações de financiamento são explicitadas em 38 dos 61 trabalhos (62,3%). A Tabela 5 mostra as fontes de financiamento, agrupadas, dos 35 estudos em que isso foi informado. Alguns estudos tiveram várias fontes de financiamento.

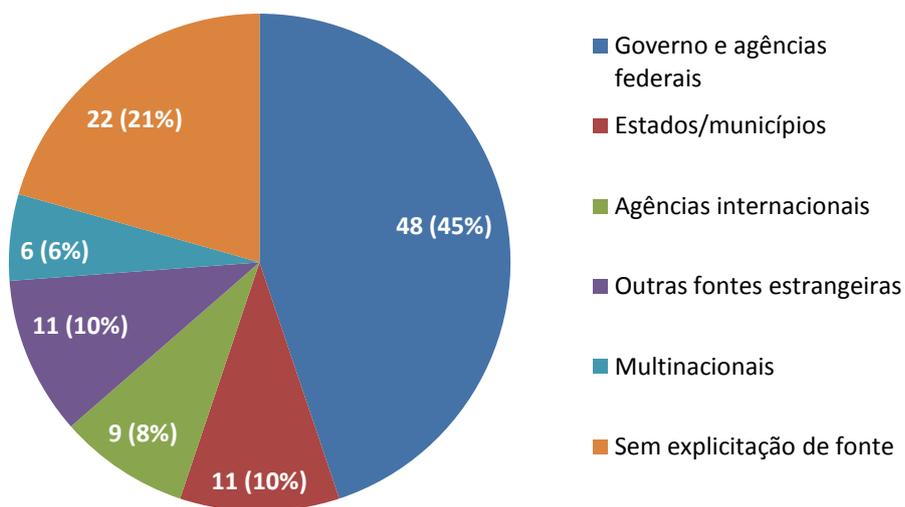
Tabela 5. Fontes de financiamento das pesquisas analisadas

Fonte de financiamento	N
Ministério da Saúde*	23
CNPq	20
CAPES	3
FINEP	2
Agências estaduais de fomento à pesquisa (FAPEMIG, FAPESP, FAPERJ, FESIMA, FAEPA)	9
SES, SMS	2
OPAS	3
UNDP/World Bank/WHO	6
International Development Research Center, Canada	1
Departamento de Desenvolvimento Internacional do Reino Unido	1
Governo da Colombia	1
NIH/NIAID	5
National Science Foundation Award, USA	1
National Center for Research Resources, USA	1
Albert Sabin Institute	1
Merck/MSD	4
GSK	1
Qiagen	1
Sem explicitação de fonte de financiamento	22

*Inclui SVS, FUNASA, PNI, IEC, Bio-Manguinhos, IOC, Fiocruz, Anvisa, CPqRR, PDTIS, Departamento Nacional de DST e Aids.

A Figura 35 mostra os dados ainda mais agrupados.

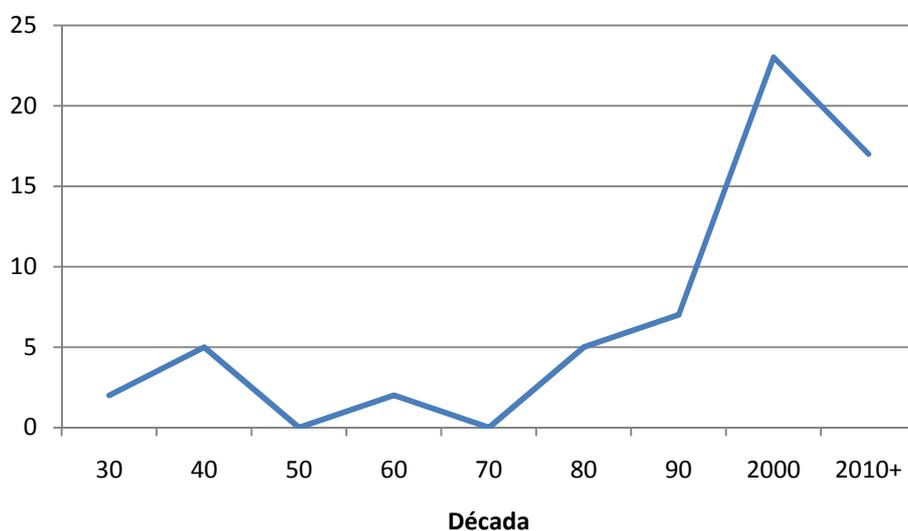
Figura 35. Fontes de financiamento das pesquisas



5.15. Estudos clínicos ao longo do tempo

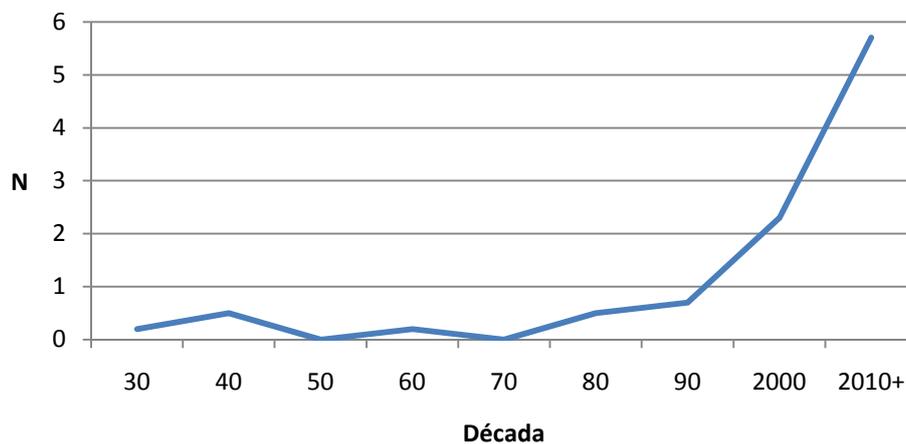
As Figuras 36, 37, 38 e 39 foram construídas a partir dos dados computados nos quadros sinópticos. O número de estudos por década é crescente (Figura 36). Nas décadas de 50 e 70 não houve estudos clínicos no âmbito da Fiocruz, de acordo com os critérios de inclusão da presente pesquisa.

Figura 36. Número de estudos clínicos com vacinas no âmbito da Fiocruz, por década



O número de estudos por ano e por década é ainda mais expressivo (Figura 37).

Figura 37. Número de estudos clínicos com vacinas no âmbito da Fiocruz por ano e por década



O número de autores e instituições envolvidas na realização dos estudos por artigo e por década também é crescente, mesmo sem incluir os grupos colaborativos (Figuras 38 e 39).

Figura 38. Numero de autores por artigo e por década

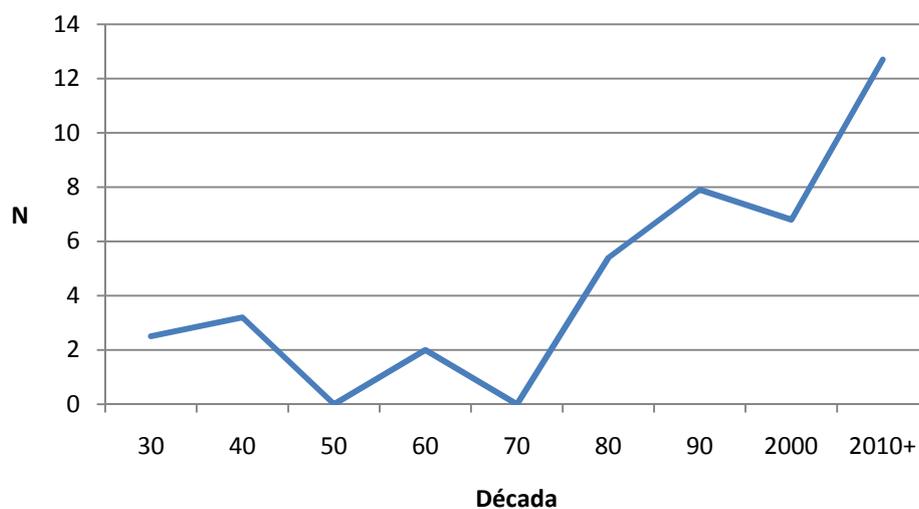
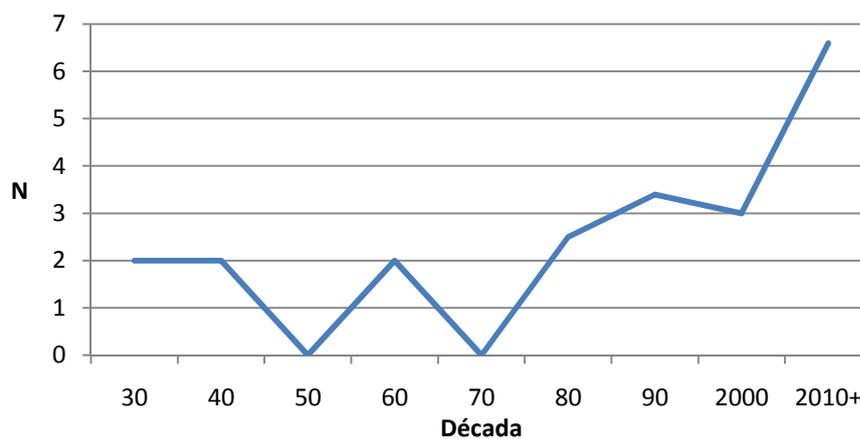


Figura 39. Número de instituições envolvidas por artigo e por década



**SEGUNDA PARTE - CONTRIBUIÇÕES DO AUTOR PARA O PROGRAMA
NACIONAL DE IMUNIZAÇÕES**

6. DO PRONTO-SOCORRO AO POSTO DE SAÚDE

Formei-me em medicina pela Faculdade Nacional de Medicina, em 1960. Comecei minha vida profissional trabalhando como acadêmico bolsista de pronto socorro e pediatra em unidades de emergência. Naquela época, início dos anos 60, desnutrição, desidratação e doenças infecciosas de toda sorte eram o dia a dia do pediatra. A frustração era grande, pois claramente a ação puramente curativa era infrutífera. Felizmente fui trabalhar em Postos de Saúde e Maternidades, onde me senti mais útil.

Nos Postos de Saúde, de recursos modestíssimos, aprendi que as ações de saúde para serem eficazes devem ser predominantemente preventivas, e entre estas as vacinações tinham papel relevante, embora o calendário vacinal naquela época fosse restrito a poucas vacinas: BCG, antivariólica, tríplice DTP, dupla contra difteria e tétano, antitetânica, contra poliomielite e logo depois, sarampo. Tínhamos que vacinar crianças com doenças não-graves, pois raramente as crianças estavam em perfeitas condições de saúde, e se não vacinásemos, elas adoeceriam ainda mais gravemente.

Aprendi a importância de ações integradas. Todas as ações preventivas eram importantes e atuavam sinergicamente: promoção do aleitamento materno exclusivo durante os primeiros meses de vida, terapia de reidratação oral para prevenção e tratamento da desidratação, vacinações, e junto com isso ações curativas incluídas na denominação de cuidados primários de saúde.

A Declaração de Alma Ata, que promoveu os cuidados primários de saúde, dentro de uma visão integrada, foi para mim um grande alento. Era o que eu já fazia, contrariando algumas posições filosóficas e ideológicas utópicas que então eram moda, por exemplo, a idéia de que Centro de Saúde é lugar somente de prevenção, e que nenhuma ação curativa deveria ser feita ali.

Esse é o problema dos que só ficam em sala de aula ou gabinetes e não passaram pelos trabalhos de campo: idéias e propostas fora da realidade, portanto inexecutáveis.

Além disso, o entendimento de muitos, provavelmente da maioria dos intelectuais e políticos da época, era de que as ações de saúde eram inúteis, ou quase

isso. A solução dos problemas de saúde residia basicamente em uma questão de justiça social. Foi a era do sociologismo em saúde.

Depois, predominou a idéia de que o desenvolvimento econômico seria a chave para a solução dos problemas de saúde. Foi a era do desenvolvimentismo em saúde.

Esses posicionamentos relegaram a educação e a saúde para um plano secundário.

Nunca compartilhei dessas idéias reducionistas, e sempre defendi que o investimento em saúde poderia render bons frutos, desde que dentro de uma visão predominantemente preventiva e em sintonia com ações econômicas, sociais e políticas. Hoje ficou ainda mais claro que os investimentos em saúde e especialmente com vacinas, longe de serem um peso, promovem o desenvolvimento econômico e social (Bloom et al. 2005). Nesse ponto, devo reconhecer que essa posição sempre foi defendida por Alvaro Aguiar, meu primeiro professor de Pediatria, um grande entusiasta das vacinações, e que muito me influenciou.

Quando em 1978 fui Vice-Presidente da Sociedade Brasileira de Pediatria, organizamos Jornadas de Vacinação por todo o Brasil, e o I Congresso Brasileiro de Infectologia Pediátrica, o primeiro a ser realizado no mundo, que desde então vem se repetindo periodicamente, agora em sua 18ª edição.

Como Presidente da Sociedade Brasileira de Pediatria, participei ativamente e mobilizei a Sociedade para apoiar os Dias Nacionais de Vacinação contra Poliomielite. Atuamos de maneira sinérgica com o Ministério da Saúde, visando promover todas as ações básicas de saúde, especialmente as vacinações, em parceria com outras instituições, como a Organização Pan-Americana de Saúde e o Unicef.

Um pouco mais tarde, ajudei a organizar e depois coordenei o Grupo de Defesa da Criança, que incluía várias instituições que lutavam pelas ações preventivas em favor da criança. Além das já citadas, o grupo incluía a Pastoral da Criança da Conferência Nacional dos Bispos do Brasil, o Instituto Brasileiro de Administração Municipal, e a Rede Globo.

A maioria dessas ações foi realizada durante a década de 80, a década perdida dos economistas. No que se refere às ações de prevenção das doenças das crianças foi uma época de ouro, e os resultados foram extraordinários.

No Ministério da Saúde, participei da Comissão Nacional de Revisão de Casos de Poliomielite, em 1989; do Grupo de Trabalho de erradicação da Poliomielite, em 1990; do Comitê Técnico Assessor em Imunizações a partir de 1995. Fui membro da Comissão Nacional de Meningite, em 1996, e da Comissão nacional de Erradicação do Sarampo e Controle da Rubéola, em 2000. Nos últimos 12 anos sou consultor Científico de Bio-Manguinhos/Fiocruz, onde minha principal área de atuação tem sido a condução de estudos clínicos com vacinas, de interesse da instituição e do Programa Nacional de Imunizações, além de assessorar a instituição e o Ministério da Saúde no campo das vacinações.

Tem havido grande avanço da vacinologia. Várias vacinas foram aperfeiçoadas, como foi o caso das vacinas contra coqueluche, sarampo e poliomielite. Surgiram várias outras vacinas, como as de rubéola e caxumba, posteriormente ainda outras, como as vacinas conjugadas de *Haemophilus influenzae* tipo b, meningocócica C e pneumocócica e a vacina de rotavírus.

O grande número de vacinas a ser aplicada obrigou a fazê-las de forma combinada, sob a forma de vacina quadrivalente DTP/Hib e pentavalente DTP/Hib/HB. Já existem vacinas hexavalentes, e aspira-se uma heptavalente.

As vacinas passaram a ser utilizadas em todas as faixas etárias. A vacina de papiloma em pré-adolescentes e adolescentes, a vacina de influenza em idosos e pessoas de grupos especiais de risco. Além disso, expandiu-se a rede de Centros de Saúde, que atualmente atendem a virtualmente toda a população, exceto em regiões remotas ou de difícil acesso. São disponíveis cerca de 34.000 salas de vacinação, e nas campanhas esse número é muito maior.

Mais recentemente, foram introduzidas no calendário de vacinações as vacinas inativada de poliomielite e de varicela. Em breve serão introduzidas a vacina de hepatite A e a vacina de pertússis tipo adulto para gestantes.

A adesão da população aos programas de vacinação tem sido imensa e os resultados alcançados extraordinários. Hoje, as doenças infecciosas evitáveis por vacina estão sob controle, erradicadas (varíola) ou eliminadas (poliomielite, sarampo e rubéola). Uma exceção é a tuberculose, para a qual precisamos de uma vacina melhor.

Entretanto, as coberturas vacinais são heterogêneas, devido a vários fatores, inclusive erros nas estimativas de população e problemas do sistema de informações.

As coberturas vacinais são mais baixas em geral nos municípios da Região Norte e do interior do país, desprovidos ou muito mal providos assistência sanitária e médica.

Um outro grupo em que as coberturas tendem a ser mais baixas são, paradoxalmente, as pessoas de classe sócio-econômica mais alta de algumas cidades, prenúncio, talvez de problemas futuros. À medida que as doenças ficam sob controle, diminui a percepção de risco, e os eventos adversos às vacinas ganham relevo. Com isso, pode haver um relaxamento em relação às vacinações, com risco de reintrodução de doenças. Além disso, a circulação alarmista sobre eventos adversos às vacinas pela internet pode estar afetando mais esse segmento da população. Estamos no Brasil atingindo esse momento, que é delicado. Muitos países da Europa, Estados Unidos e Japão passaram por epidemias de doenças que pareciam controladas, com dramáticas conseqüências (Offit & DeStefano 2013)

O Ministério da Saúde está implementando um Sistema de Informações do Programa Nacional de Imunizações que deverá permitir uma análise muito melhor das coberturas vacinais, que passará a dar informações individuais, e assim direcionar melhor e em tempo mais oportuno as ações corretivas.

Em muitas apresentações em reuniões e congressos, e em capítulos de vários livros de vacinologia e doenças infecciosas, que são referências científicas amplamente consultadas, procurei divulgar o valor e alcance inestimável das vacinas, como por exemplo, em um capítulo do livro “Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias” de Coura (2013) (Martins et al. 2013a). Tenho colaborado com a Organização Mundial de Saúde, na área de farmacovigilância em vacinas, representando Bio-Manguinhos no CIOMS/WHO - Council of International Organizations of Medical Sciences, e DCVMN – Developing Countries Vaccine Manufacturer`s Network, no IPAC/WHO - Immunizations Practices Advisory Committee, e fui co-autor de vários trabalhos nessa área, publicados em revistas indexadas ou apresentados em congressos nacionais e internacionais.

À medida que as doenças foram sendo controladas, tornou-se necessário cuidar dos eventos adversos pós-vacinais. Participei como editor da 1ª edição do Manual de Vigilância Epidemiológica dos Eventos Adversos Pós-Vacinais, do Ministério da Saúde, por meio de contratos de trabalho com o Ministério da Saúde (Ministério da Saúde 1998), cuja 3ª edição está no prelo.

Pessoas em situações especiais de risco e imunodeficientes precisavam de vacinas e esquemas vacinais que não eram utilizados na rede habitual dos Centros de Saúde. Criou-se então uma rede – os Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais (CRIEs), para atendê-las, que hoje totalizam 42. Também aqui colaborei com o Ministério da Saúde, por meio de contratos de trabalho, para editar outros manuais: O “Manual dos Centros de Referência em Imunobiológicos Especiais” (Ministério da Saúde 2001), cuja 4ª edição está no prelo, “Recomendações para Imunização Ativa e Passiva de Doentes com neoplasias” (Ministério da Saúde 2002a), e “Recomendações para Vacinação em Pessoas Infectadas pelo HIV” (Ministério da Saúde 2002b).

Em 1999 o Ministério da Saúde adquiriu grande volume de vacinas de hepatite B recombinante do Instituto Butantan. Entretanto, os estudos clínicos realizados com essa vacina tinham incluído pequeno número de voluntários e se restringiam a adultos. O Comitê Técnico Assessor em Imunizações do Ministério da Saúde e a comunidade científica não aceitaram a inclusão da vacina na rotina dos serviços de saúde. Em um certo momento, fui solicitado a coordenar um estudo que pudesse esclarecer as dúvidas sobre a vacina do Instituto Butantan. Esse estudo multicêntrico, envolvendo cerca de 4.000 voluntários, desde recém-nascidos até adultos, foi publicado nas Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. É um dos maiores estudos com vacinas já realizados no Brasil, foi fundamental para o fortalecimento do Instituto Butantan, e permitiu a inclusão da vacina de hepatite B no calendário vacinal de rotina do PNI (Martins et al. 2004).

O segundo grande desafio surgiu quando a vacina de *Haemophilus influenzae* tipo b do laboratório SmithKline foi combinada com a vacina DTP, do Instituto Butantan. Surgiram rumores na rede de saúde pública de um aumento na incidência da ocorrência de episódios hipotônico-hiporresponsivos (um episódio de desmaio transitório e benigno, mas assustador), após a sua introdução. Chegou-se a cogitar na suspensão da vacina. Propusemos e realizamos um grande estudo de vigilância ativa de eventos adversos após a vacina DTP/Hib, envolvendo cerca de 21.000 crianças, o qual também foi publicado, no Jornal de Pediatria da Sociedade Brasileira de Pediatria. O estudo mostrou que a vacina DTP/Hib então utilizada tinha o perfil de segurança semelhante ao de outras vacinas similares utilizadas em outros países (Martins et al. 2007). Esse é o maior estudo de vigilância ativa desenhado especificamente para

avaliar eventos adversos após a vacina DTP/Hib, ainda maior do que o estudo clássico de Cody et al (1981), que envolveu 15.752 crianças vacinadas com DTP. Essa questão não é trivial. A introdução das vacinas combinadas incluindo o componente pertússis de células inteiras tem provocado crises e suspensão temporária das vacinas em vários países, devido a eventos adversos, como em Sri Lanka, Bhutan e Vietnam (Global Advisory Committee on Vaccine Safety 2013).

Posteriormente, completou-se a transferência de tecnologia do componente Hib para Bio-Manguinhos, e realizamos um estudo clínico com essa vacina, envolvendo 1.000 crianças, o qual validou a vacina clinicamente e permitiu a sua utilização na rede. Foi publicado nas Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Martins et al. 2008)

No final do ano 2008 e início de 2009 houve uma expansão súbita da circulação do vírus selvagem da febre amarela no Brasil e em outros países. Bio-Manguinhos não conseguiu atender a essa demanda súbita. O Ministério da Saúde não permitiu a utilização da vacina em doses menores, pois o estudo anterior com a vacina 17DD (Lopes et al. 1988) tinha sido feito com amostragem pequena e utilizando metodologias diferentes das atuais. Esse estudo era também de interesse da Organização Mundial de Saúde, pois existe uma escassez da vacina de febre amarela em escala mundial. Realizamos então um estudo de dose-resposta com a vacina de febre amarela, em adultos jovens, o maior e mais completo feito até agora, que mostrou claramente que a vacina pode ser utilizada em doses muito menores que as atuais, pelo menos nessa população (Martins et al. 2013).

O estudo de dose-resposta, além disso, quebrou alguns conceitos errôneos. Por exemplo, a de que existe uma relação inversa entre dose e resposta imune (Monath, 2013). Essa afirmativa era baseada em estudos realizados em animais por Fox & Penna (1943), e em alguns estudos clínicos com resultados contraditórios ou inconsistentes (Smith et al. 1962; Freestone et al. 1977; Fox et al. 1943). Nos estudos em macacos de Mason et al (1973), no estudo clínico de Lopes et al. (1988) e no que conduzimos, é claro que doses menores induzem respostas similares à dose padrão, em adultos jovens, mas que, ao serem reduzidas as doses, após um certo patamar de redução, as respostas imunes diminuem.

Além disso, mostramos que cópias de vírus obtidas por RT-PCR quantitativo podem ser obtidas do sangue dos voluntários durante até quatro semanas ou mais

após a vacinação, o que implica em alerta para o falso diagnóstico de doença viscerotrópica, como definida pela Brighton Collaboration (Gershman et al. 2012). Esse grupo incluiu como critério de confirmação de doença viscerotrópica a amplificação de RNA viral do sangue após 14 dias de vacinação contra febre amarela.

Outros estudos imunológicos, explorando citocinas, estão sendo conduzidos com material biológico do estudo de dose-resposta, pelo grupo do Centro de Pesquisas René Rachou, e os resultados deverão ser disponíveis brevemente.

Esse estudo precisa ser realizado em crianças, nas quais a imunogenicidade da vacina de febre amarela é menor, para que os resultados possam ser generalizados. Entretanto, em caso de necessidade, temos melhor fundamentação para aplicar a vacina de febre amarela em doses menores, com isso aumentando sua disponibilidade.

Em 2007, foram diagnosticados quatro casos fatais de doença viscerotrópica no Peru, após campanha de vacinação contra febre amarela, todos relacionados a um mesmo lote (Whittembury et al. 2009). Em auditoria realizada pela OMS em Bio-Manguinhos, nenhum erro relacionado à produção foi encontrado, mas fomos questionados sobre a ausência de notificações de eventos neurológicos, quando os mesmos estavam sendo diagnosticados fora do Brasil (McMahon et al. 2007). Por essa razão, quando se preparava uma grande campanha de vacinação no Rio Grande do Sul, solicitamos que se procurassem esses eventos e explicamos à responsável pelos eventos adversos da campanha (Dra. Renate Mohrdieck) os critérios diagnósticos do *Centers for Disease Control and Prevention*, que os repassou para a rede. Foram assim diagnosticados e confirmados por um grupo de farmacovigilância no Ministério da Saúde, com a participação de especialistas, inclusive neurologista, muitos eventos neurológicos pós-vacinação contra febre amarela, mais do que esperávamos. Mais uma vez se confirma a observação: só se encontra o que se procura, e só encontra quem sabe procurar.

Os eventos adversos após a vacinação contra febre amarela ensejaram uma apresentação, por solicitação da Organização Mundial de Saúde, numa reunião internacional em Bamako, Mali, e um artigo sobre o tema foi publicado (Martins et al. 2007). Estamos preparando um outro artigo sobre eventos neurológicos após a vacina de febre amarela, o qual deverá ser publicado brevemente.

Desde que chegamos a Bio-Manguinhos, no início de 2002, participamos do desenvolvimento autóctone, isto é, na própria instituição, de vacinas meningocócicas, produzidas pela tecnologia de vesículas de membrana externa do meningococo B (vacina meningocócica B), ou por conjugação do polissacarídeo capsular do meningococo C ao toxóide tetânico (vacina meningocócica C). O Laboratório de Tecnologia Bacteriana, LATEB, tem liderado esse desenvolvimento. Realizamos assim estudos clínicos de fase I e II com essas vacinas, que foram aprovados pelas Comissões de Ética, Comitês Independentes de Monitoramento de Dados e Anvisa, e foram apresentados e publicados em Anais de congressos internacionais de Neisseria (Martins et al. 2009a; Martins et al. 2009b; Martins et al. 2010). Esses são, de nosso conhecimento, os primeiros estudos clínicos de fase I realizados com vacinas bacterianas desenvolvidas no Brasil. Realizamos também estudos de fase II com a vacina meningocócica C (Engstrom et al. 2012) e o estudo de fase II com a vacina meningocócica B está sendo concluído.

O grande número de vacinas injetáveis é traumatizante para as crianças e seus pais. Foi por essa razão que conduzi como investigador principal um estudo com a vacina tríplice viral sarampo-caxumba-rubéola, comparando a segurança, imunogenicidade e aceitação dessa vacina aplicada da maneira convencional, com agulha e seringa, com a aplicação por meio de um dispositivo sem agulha. Foi uma parceria de Bio-Manguinhos com a PATH – uma organização internacional que recebe financiamentos da Fundação Bill & Melinda Gates e atua em vários projetos de interesse da OMS. O estudo está encerrado, o relatório final foi aprovado por Bio-Manguinhos e pela PATH, e deverá ser publicado proximamente.

Colaborei ainda participando como co-autor de vários outros estudos com vacinas, alguns concluídos, outros em andamento.

Devo ressaltar que todas essas pesquisas envolveram redes de colaboração, e equipes integradas, solidárias e comprometidas. A criação e estruturação da Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos viabilizou essas pesquisas clínicas de interesse da instituição e do Programa Nacional de Imunizações. O apoio da Direção de Bio-Manguinhos/Fiocruz tem sido fundamental. A todos o meu agradecimento.

Os artigos publicados em revistas indexadas, ou apresentações em congressos internacionais, em que fui primeiro autor, ou pesquisador principal, relacionadas a essa segunda parte, estão anexados em papel.

O conteúdo dessa tese, bem como o texto integral de todos os estudos clínicos analisados, estão disponibilizados em meio magnético (DVD).

6.1. Anexo. Íntegra de todos os trabalhos com vacinas em que o autor da tese participou como pesquisador principal e/ou primeiro autor.

Fornecidos separadamente, ao final da tese, e com numeração de página independente, pois são transcrições de artigos publicados.

7. DISCUSSÃO

A revisão e reflexão sobre os estudos clínicos realizados com participação do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, iniciados na década de 30 do século passado, têm várias características comuns (Tabela 2).

Em primeiro lugar, todos foram feitos para dar respostas a questões relevantes de saúde pública do Brasil e se destinaram a contribuir para o programa de imunizações, hoje o Programa Nacional de Imunizações. Mas, as pesquisas e os sucessos do PNI contribuíram para a saúde pública de muitos países além do Brasil.

Os estudos com vacinas experimentais de febre amarela fazem parte da história universal das vacinas. Foram os estudos realizados no Brasil, sob orientação dos pesquisadores do Instituto Rockefeller, mas com ativa participação e contribuição brasileira, que permitiram a adoção da vacina de febre amarela na rotina dos serviços de saúde pública, no Brasil e em outros países, permitindo o controle dessa terrível doença. Ousamos afirmar, tendo em vista o impacto negativo da febre amarela sobre a saúde coletiva e a vida social e econômica, que o Brasil estaria fadado à estagnação e ao atraso, sem esta vacina.

Os estudos com a vacina de febre amarela também contribuíram para melhor entendimento da dose-resposta e duração da imunidade.

Os estudos de resposta imunológica inespecífica com a vacina de febre amarela dão subsídios para entender melhor os eventos adversos graves que podem ocorrer com essa vacina.

Os estudos com a vacina de sarampo foram realizados para viabilizar a transferência de tecnologia, garantindo o fornecimento regular de vacina de boa qualidade, permitindo o seu uso em larga escala e eliminando essa doença, uma das principais causas de mortalidade e fator relevante para agravamento da situação nutricional de crianças no Brasil.

Os estudos com a vacina de poliomielite, e muitos outros estudos de natureza soro-epidemiológica, permitiram a mudança na composição da vacina e criaram as condições para a eliminação dessa doença incapacitante no Brasil e em muitos outros países da América Latina.

Os estudos com a vacina BCG visaram saber se a revacinação BCG é justificável, um questionamento de saúde pública. Com base nesses estudos, a revacinação BCG foi excluída do calendário regular de vacinações, passando a ser feita somente em crianças contatantes de hanseníase.

A participação do Instituto Oswaldo Cruz nos estudos clínicos permitiu a introdução da vacina recombinante de hepatite B do Instituto Butantan na rotina do Programa Nacional de Imunizações.

Os estudos clínicos com a vacina combinada DTP/Hib – contra difteria, tétano, coqueluche e *Haemophilus influenzae* do tipo b, permitiram a transferência de tecnologia da vacina Hib, a introdução dessa vacina no calendário de vacinas no Brasil e reduzir drasticamente a incidência da difteria, tétano, coqueluche e infecções invasivas pelo Hib.

Os estudos com a vacina tríplice viral contribuíram para a sua introdução na rotina de imunização do PNI, e os novos estudos que estão sendo feitos atualmente, ainda não publicados, viabilizarão a transferência completa de tecnologia.

Os estudos com a vacina de sarampo e influenza em HIV positivos darão subsídios para a sua utilização nessa população vulnerável.

Os estudos com a vacina de rotavírus, embora feitos com uma vacina que não foi introduzida no PNI, foram importantes para avaliar a dinâmica dessas infecções e reinfecções após a vacinação.

Os estudos com a vacina de papiloma tetravalente – a mesma que foi adotada no Brasil pelo PNI – deram suporte para a sua introdução no calendário vacinal e poderão contribuir futuramente para a sua utilização no sexo masculino.

A Tabela 3 mostra que os estudos realizados com vacinas virais e bacterianas conduziram ao licenciamento de vacinas, ou foram feitos com vacinas já licenciadas. Chama a atenção que quase metade dos estudos com vacinas licenciadas (48%) foram feitos com a vacina de febre amarela, o que mostra a importância dessa doença para o Brasil e o mundo, e os esforços que vêm sendo feitos para aperfeiçoá-la. Os estudos para doenças parasitárias – malária, leishmaniose e necatoríase – não permitiram o licenciamento de vacinas para uso nos serviços regulares de saúde. Os estudos sem resultados favoráveis são importantes e deixam ensinamentos. Uma vacina contra malária certamente seria um enorme benefício para as populações de áreas

endêmicas, no Brasil, América Latina e demais regiões tropicais. Para os países não endêmicos, seria uma vacina importante para os viajantes. Infelizmente, a vacina de Patarroyo, que tinha uma concepção tecnológica avançada, mostrou resultados decepcionantes, no estudo realizado em Rondônia, no Brasil, aqui revisado, e em outros países.

Os estudos de imunogenicidade e segurança com vacinas de *Leishmania*, que pareciam promissores, não sustentaram as avaliações de eficácia, isto é, o seu poder de reduzir significativamente os casos de doença.

Para outra endemia parasitária - as infecções por Ancilostomídeos, o estudo realizado em Minas Gerais mostrou uma reatogenicidade inesperada, reações alérgicas ao antígeno vacinal, fenômeno não verificado em estudo similar, realizado em área não endêmica dos Estados Unidos. Isso mostra a importância das peculiaridades locais sobre os resultados dos estudos com vacinas. No caso em apreço, a diferença deveu-se à endemicidade ou não da Ancilostomíase no local do estudo. Em outras situações, as diferenças podem dever-se a fatores genéticos ou ambientais, modificando o perfil da resposta imune ou reatogenicidade às vacinas.

Devido ao grande tamanho e variabilidade dos parasitos, à multiplicidade de epitopos, e a mecanismos anti-infecciosos que são muito diferentes dos vírus e bactérias, os desafios para o desenvolvimento de vacinas para doenças parasitárias são imensos, exigindo novas abordagens. Para a malária, surgem tentativas visando bloquear a transmissão no mosquito, com vacinas direcionadas contra estágios sexuados do *Plasmodium falciparum* (Biswas et al. 2013). No caso da leishmaniose, talvez se possa ter uma abordagem combinando diversas estratégias, por exemplo, antígenos em nanopartículas (Santos et al. 2013) ou uma combinação de tratamento e imunoterapia (Nascimento et al. 2010, Machado-Pinto et al. 2002). Talvez a abordagem tradicional por vacinas preventivas tenha que ser modificada, para objetivos mais modestos mas ainda assim valiosos, visando não a eliminação ou erradicação dos parasitos, mas a atenuação da doença ou sua contenção.

As dificuldades de obtenção de vacinas para alguns agentes infecciosos, como os vírus instáveis geneticamente, como o HIV, a hepatite C, ou mesmo melhores vacinas para os vírus influenza, sublinham a necessidade de novos estudos, a adoção de novas tecnologias, como adjuvantes e novas formas de apresentação de antígenos,

ou novas formas de introdução de antígenos, explorando alternativas, como as vacinas através de mucosas ou transcutâneas. Tudo isso necessitará de estudos clínicos, para validar ou não os novos processos.

Também pode haver alternativas já conhecidas, mas ainda não devidamente implementadas, por vários fatores, de ordem econômica, social ou cultural. Por exemplo, a ancilostomíase ou a esquistossomose podem ser controladas por higiene pessoal, uso de latrinas, e botas.

Os estudos clínicos são necessários para a introdução de novos produtos. Sabemos que há, intrinsecamente, um risco na experimentação humana. Para que o estudo clínico seja justificado, é preciso ficar demonstrada a necessidade do produto, e ter uma base científica por meio de estudos não-clínicos, de que o produto, em princípio, é seguro e eficaz. Em todos os casos, os estudos clínicos são conduzidos de forma progressiva, começando com pequeno número de voluntários e aumentando paulatinamente o número de voluntários, em fases distintas. São estudos altamente controlados, e com consentimento livre e esclarecido, de acordo com os princípios éticos e as boas práticas clínicas, estabelecidos em legislação específica, a cargo da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e da Agência reguladora – a Anvisa. Os produtos em teste devem ser produzidos em condições de boas práticas de fabricação e de laboratório.

A alternativa seria a introdução das vacinas em larga escala, apenas com base em características químicas e físicas, ou estudos em animais, um risco inaceitável.

Em nenhum dos estudos revisados paira dúvida sobre a lisura dos procedimentos e financiamentos, embora muitas vezes estes não sejam explicitados, especialmente nos primeiros estudos. Similarmente, a formalização ética e regulamentar dos estudos só ocorre mais tardiamente, à medida que a legislação é estabelecida e é implementada.

Os estudos clínicos com vacinas revisados nessa tese tiveram uma base científica sólida e foram realizados de maneira ética, levando-se em conta a época em que foram realizados. Há duas situações, entretanto, que merecem reflexão. No estudo em que se pesquisou a causa da encefalite após a vacinação de febre amarela, (Fox et al. 1942), a insistência em continuar usando um dos lotes incriminados, no estudo seguinte, na área de Guaxupé, pode ser questionado, mesmo levando em conta

as dificuldades de entendimento da época. Outro episódio que pode dar margem a questionamentos éticos, ainda hoje, foi a insistência em continuar usando soro humano na preparação da vacina de febre amarela, nos Estados Unidos, contra a opinião de Fred Soper e dos pesquisadores brasileiros, o que acarretou uma grande epidemia de hepatite nos militares americanos.

Deve-se ressaltar que em ambos os casos não houve dolo. O que confundiu e induziu a erro os pesquisadores foi sobretudo a heterogeneidade de informações da vigilância sobre a frequência de eventos adversos, problema que até hoje não foi resolvido satisfatoriamente.

A preocupação ética nos estudos revisados foi evidente. Por exemplo, o primeiro grande estudo realizado com a vacina 17 D, semelhante à usada atualmente (Smith et al. 1938, revisado em 5.1.2) foi realizado somente após a aquisição de uma grande base experimental pré-clínica, e após uma primeira vacinação em pequeno número de pessoas, incluindo os próprios pesquisadores. A implementação do estudo foi progressiva, somente incluindo novos grupos de pessoas após avaliação do grupo anterior, tanto quanto à segurança quanto à imunogenicidade. Vacinaram-se primeiro adultos, e a idade dos participantes foi sendo diminuída paulatinamente. Assim, embora sem cumprir as etapas agora clássicas de estudos em fase I, fase II, fase III, na prática essas etapas foram seguidas. Entretanto, é preciso reconhecer que ainda não havia termo de consentimento livre e esclarecido nos primeiros estudos com vacinas, o que só foi estabelecido como prática muitos anos depois.

O estudo citado acima foi realizado com a melhor ciência da época, e a sequência dos estudos com a vacina de febre amarela 17D deu a Max Theiler o Prêmio Nobel de Medicina. É importante ressaltar o comportamento ético de Theiler – ele foi um dos principais pesquisadores que desenvolveram a vacina de febre amarela chamada francesa, que era eficaz mas bastante neurotrópica. Insatisfeito com esta vacina, por causa dos eventos adversos que poderia causar, ele recomeçou os estudos, com outra cepa, e após exaustivos experimentos em animais, somente iniciou os estudos clínicos quando obteve atenuação aceitável do vírus, tornando-o muito menos neurotrópico e aceitável para uso humano.

Lição aprendida é a necessidade de boas práticas de laboratório, evidenciada pelas pesquisas com a vacina de febre amarela, nas quais um grande número de

pesquisadores adquiriu febre amarela por contaminação no laboratório, com dezenas de mortes. Chama a atenção a falta de cuidado com a proteção das mãos nas manipulações de laboratório.

Após os estudos pioneiros das décadas de 30 e 40, houve uma quase paralisação durante as décadas de 50, 60 e 70 (trinta anos!), uma retomada tímida nas décadas de 80 e 90, e um grande impulso a partir da década de 2000 (Figuras 36, 37). Deve-se alertar que essa análise tem a limitação imposta pelos critérios de inclusão.

O número de autores e instituições por artigo e por década é crescente, refletindo a maior complexidade dos estudos e o maior número de parcerias, bem como uma preocupação louvável em reconhecer a co-autoria das pesquisas (Figuras 38, 39).

Nos estudos mais recentes, progressivamente foram sendo formalizados os procedimentos de regulação e éticos, como a aprovação do protocolo pelas Comissões de Ética, declarações de conflito de interesse, explicitação das fontes de financiamento, o registro internacional e os procedimentos de suporte, como o “check list” Consort (Tabela 4). Deve-se levar em conta que a primeira Resolução do Conselho Nacional de Saúde sobre estudos clínicos, a Resolução 196, é de 1996, a Declaração Consort (“Consolidated Standards of Reporting Trials”) é de 2001, revisada em 2010, e o registro internacional é uma recomendação da OMS, de 2006, e só recentemente passou a ser exigido para publicação em revistas proeminentes.

O primeiro estudo que explicita critérios de inclusão é o de Fox & Cabral (1943), revisado em 5.1.6. O primeiro estudo em que se explicita o termo de consentimento é o de Patriarca et al. (1988), revisado em 5.3.3. Lopes et al. (1988) falam de “voluntários”, mas não fica claro o processo de consentimento. O primeiro estudo com cálculo amostral é o de Camacho & Klein (1990) revisado em 5.4.1. O primeiro estudo clínico que se refere explicitamente a uma comissão de ética que aprovou o estudo foi o de Urdaneta et al. (1996), revisado em 5.11.1. Esse estudo foi pioneiro em muitos sentidos, sendo também o primeiro estudo randomizado, duplo cego, e com placebo. O primeiro estudo a declarar formalmente conflito de interesse é o de Camacho et al. (2004), revisado em 5.1.12. O primeiro registro internacional é o de Silva et al. (2011), revisado em 5.1.15. O primeiro estudo a fornecer informações de

suporte, como o “check list” CONSORT e acesso ao protocolo é o de Santini et al. (2012), revisado em 5.9.1.

A fonte de financiamento não é informada explicitamente em muitos estudos. Os casos em que não houve essa informação referem-se em geral aos primeiros estudos, envolvendo o governo brasileiro e a Fundação Rockefeller, ou pequenos estudos realizados em serviços públicos.

A presença predominante do financiamento federal e estadual é evidente na Tabela 5 e na Figura 35, e na verdade é ainda maior, se incluíssemos como governamentais os estudos em que o financiamento não foi informado, mas foi claramente governamental.

Nos estudos envolvendo empresas multinacionais produtoras de vacinas a questão da transparência e da necessidade de “financial disclosures” é mais evidente. Isso pode ser exemplificado pelos estudos com a vacina de papiloma, aqui revisados, em que as “financial disclosures” mostram o enorme envolvimento dos pesquisadores com várias empresas comerciais produtoras de vacinas e outros imunobiológicos.

Alguns estudos cujos resultados não foram favoráveis foram publicados, procedimento elogiável e necessário, pois, como referimos acima, os insucessos ou resultados insatisfatórios podem contribuir com informações importantes, minimamente para evitar que outros pesquisadores repitam os mesmos erros.

É animador ver que nos últimos anos os estudos clínicos receberam grande impulso no âmbito da Fiocruz. Do ponto de vista de metodologia de pesquisa, os estudos feitos recentemente incluíram estudos randomizados e duplos cegos, com cálculos de amostragem bem fundamentados e planos de análise.

Assim, o progresso se observa não apenas do ponto de vista quantitativo, mas também qualitativo.

Para esse progresso, foram fundamentais os documentos éticos provenientes do Conselho Nacional de Saúde, as normas de Boas Práticas Clínicas do Documento das Américas e da Anvisa, a criação das Organizações Representativas de Pesquisa Clínica, inclusive a Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos, e a maior disponibilidade de recursos técnicos.

Entre esses, vale destacar o acesso à literatura científica da maior qualidade, graças principalmente ao Portal de Periódicos CAPES, e a um melhor conhecimento de

metodologia estatística, muito ajudada por *softwares* de ótima qualidade, que facilitaram o cálculo amostral e as análises de dados.

A contribuição da Fundação Oswaldo Cruz para o desenvolvimento de novas vacinas tem sido relevante, em dois aspectos: o aperfeiçoamento tecnológico de processos e as transferências de tecnologia.

No aperfeiçoamento de processos, eles foram relevantes nos primórdios da produção da vacina de febre amarela, principalmente por Henrique de Azevedo Penna, que introduziu modificações no processo de obtenção do suco vacinal, o que permitiu dispensar a adição de soro humano, com isso evitando o risco de hepatite B. Também a Fiocruz deu contribuição relevante para a reformulação da vacina oral contra poliomielite.

As transferências de tecnologia foram um ponto fundamental da história da Fiocruz, desde a vacina contra febre amarela (Instituto Rockefeller), as vacinas polissacarídicas AC (Instituto Mérieux), as vacinas de poliomielite e sarampo (Instituto Biken), as vacinas contra *Hemophilus influenzae* tipo b, sarampo/caxumba/rubéola e de rotavírus (GSK), e brevemente será introduzida a vacina contra varicela. Além de permitir a introdução relativamente rápida de novas vacinas no Programa Nacional de Imunizações, as transferências de tecnologia viabilizaram a criação, ampliação e aperfeiçoamento de fábricas e laboratórios, e permitiram a formação e aprimoramento de muitos profissionais que hoje são o patrimônio mais importante da Fiocruz. Não se deve subestimar o alcance desse processo para a Fiocruz e para o Programa Nacional de Imunizações. As transferências de tecnologia foram possíveis porque a Fiocruz teve capacidade de absorver as tecnologias envolvidas.

Entretanto, é preciso reconhecer que as inovações que conseguimos introduzir foram incrementais, não mudaram paradigmas. A inovação que resulta em saltos tecnológicos é um processo que começa muitos anos antes, envolve muitos segmentos da ciência e tecnologia, e precisa de uma massa crítica de recursos humanos e tecnológicos para que possa acontecer. Além disso, depende de uma atitude corajosa das pessoas, uma disposição de questionar o que está estabelecido, de procurar caminhos e soluções novas.

Ainda mais, embora planejamento, foco, determinação e disciplina sejam fundamentais, o processo de inovação tem forte componente lúdico e no qual a

serendipidade tem papel relevante. Assim, é preciso estar aberto para o inesperado, o dado novo, a nova perspectiva que se abre. A rigidez burocrática é inimiga da inovação.

Talvez a única contribuição realmente original do IOC/Fiocruz do ponto de vista de inovação, no que se refere a vacinas, tenha sido a vacina da manqueira, contra o *Clostridium chauvoei*, desenvolvida por Alcides Godoy. No entanto, a proibição pelo Ministério da Educação e Saúde de sua comercialização pelo Instituto Oswaldo Cruz inibiu essa linha pragmática de pesquisa associada à comercialização.

É preciso ainda reconhecer que o número de estudos clínicos que conseguimos resgatar – sessenta e um, num período que começa em 1938, e termina em 2013, 76 anos, é inferior ao desejável e necessário, tendo em vista os graves problemas de saúde causados por agentes infecciosos, potencialmente evitáveis por vacinas. Ainda assim, fica claro que nos últimos anos os estudos clínicos deixaram de ser um obstáculo à inovação tecnológica no âmbito da Fiocruz. A presente pesquisa põe em evidência que a Fiocruz está apta a realizar estudos clínicos em todas as fases.

A inovação é um caminho cheio de imprevistos, incertezas, fracassos e sucessos, isto é, envolve riscos e exige persistência. A história das vacinas está repleta de exemplos. Os vitoriosos foram os que não desistiram, mesmo tendo que enfrentar enormes desafios.

É necessária uma mudança institucional que flexibilize os processos administrativos, facilite e estimule as parcerias, alivie o pesquisador de um cipoal burocrático muitas vezes inútil e caro, recompense o esforço, e não penalize o insucesso.

Além disso, é necessária uma melhor conexão de Bio-Manguinhos/Fiocruz com as práticas comerciais, para que possa dispor de nova escala de recursos e competitividade.

A criação da rede de pesquisa clínica tem méritos, mas seria importante percorrer o caminho inverso, isto é, detectar as parcerias já existentes e que têm mostrado bons resultados e apoiá-las.

Se temos sido pobres em inovação tecnológica, temos sido inovadores na concepção ética de que as vacinas devem ser um bem que faz parte dos direitos da

cidadania, e que todos devem ter acesso livre às imunizações. Vacinas devem ser como saneamento básico e educação: todos devem ter acesso livre a esses bens básicos.

Os estudos clínicos são uma atividade nobre e os pesquisadores exercem uma atividade relevante para a saúde da população.

Está havendo um progresso na consciência ética da sociedade. Na raiz da maioria dos problemas éticos estão os preconceitos e a arrogância – a falsa idéia de que há categorias de pessoas, algumas delas mais detentoras de direitos do que outras.

Hoje temos muito maior cuidado do que no passado em formalizar e documentar os aspectos éticos dos estudos clínicos. A legislação ética é minuciosa, está em constante aperfeiçoamento, e os cursos de boas práticas clínicas são repetidos periodicamente. Ainda assim, precisamos estar atentos para que, além do cumprimento formal das normas, a atitude dos profissionais de pesquisa seja sempre respeitosa para com todos os que participam das pesquisas clínicas – membros da comunidade, voluntários, colegas de pesquisa e responsáveis pelas instituições envolvidas.

Mas, tudo que é demais, pode deixar de ser bom. É preciso cuidado com os exageros, exigências irrealistas ou normas centralizadoras, que podem inibir as pesquisas e acarretar perdas de oportunidades. Um exemplo é a legislação brasileira sobre uso de placebo, mais exigente do que a própria Declaração de Helsinki, uma referência internacional de orientação ética.

Se for cometido algum erro, devemos reconhecê-lo imediatamente e relatá-lo. O erro num estudo clínico é quase inevitável, tendo em vista a complexidade e nível de detalhe dos procedimentos. O que podemos é empenhar-nos para que os mesmos não sejam críticos e corrigi-los imediatamente. Um erro relatado e corrigido pode evitar muitos outros erros.

Algumas reflexões adicionais. Não sendo filósofo, mas sabendo que a reflexão filosófica é importante, atrevo-me a tecer algumas considerações gerais sobre as implicações das pesquisas e progressos em vacinas.

Os filósofos da ciência gostam de exemplificar revoluções científicas com as teorias astronômicas de Copérnico, Isaac Newton e Einstein, ou a teoria da evolução

de Darwin. Essas teorias físicas e biológicas tiveram sem dúvida importantes conseqüências para a concepção e compreensão do mundo.

Com Copérnico e Newton, o homem e a terra deixam de ser o centro do universo, e Darwin evidencia a incessante evolução e competição biológica de todos os seres vivos pela sobrevivência.

Einstein percebeu que as leis da física são relativas, devendo-se levar em conta os movimentos, o tempo e a velocidade da luz. Com a sua famosa equação $E = MC^2$, propôs que massa e energia são dois aspectos intercambiáveis da realidade.

Planck e Bohr avançaram no conhecimento físico da natureza, com a mecânica quântica e a compreensão probabilística dos fenômenos.

Cada uma dessas revoluções implicou numa mudança de paradigma, isto é, uma nova maneira de perceber e interpretar o mundo.

O ser humano deixou de ser o soberano da natureza para transformar-se num minúsculo elo da cadeia física e biológica na terra, por sua vez um minúsculo planeta, e não é possível ter certeza de nada.

Entretanto, por mais aleatórios que pareçam ser os eventos físicos e biológicos, há uma ordenação profunda dos processos cuja compreensão começa a emergir (Lenzi & Vannier-Santos 2013).

Nas últimas décadas houve várias revoluções na biologia.

A descoberta da etiologia microbiana de doenças infecciosas, e da vacinologia, que tiveram em Pasteur o seu principal criador, e em Jenner seu principal precursor, provocaram uma revolução científica, com implicações filosóficas, e abriram o caminho para extraordinárias descobertas no campo das doenças infecciosas e da imunologia.

Pasteur consumiu uma parte de sua vida combatendo as idéias da geração espontânea e dos miasmas. Isso era necessário, para que as pessoas e o ambiente cultural se abrissem para novas maneiras de pensar, novos métodos de pesquisa e novas abordagens.

Ter uma atitude mental adequada é vital para que as descobertas científicas aconteçam.

A observação empírica é a base do método científico, mas é preciso ter visão sistêmica para ter compreensão e abordagem sistemática para focar o campo de

observação, aprofundá-la, formular hipóteses que possam explicar os processos, e testar essas hipóteses com pesquisas que sejam capazes de responder às perguntas .

Como dizia Pasteur, a sorte beneficia as mentes bem preparadas, e só entende o que acha quem sabe o que procura.

A teoria microbiana para a compreensão de processos químicos e da etiologia de numerosas doenças, a compreensão dos mecanismos imunológicos pré-existentes no hospedeiro, bem como a possibilidade de prevenção utilizando artifícios para atenuação ou inativação, abriram as portas para uma sucessão de novas descobertas, com profundo impacto na sociedade.

Doenças e epidemias deixaram de ser castigo divino. A natureza não é perfeita, mas sábia, e é preciso decifrá-la com instrumentos adequados, por exemplo, microscópios, matemática e metodologia que permitam perceber e entender o que está sendo pesquisado.

Entretanto, embora a metodologia científica seja extremamente relevante para que seja possível chegar a conclusões seguras, a motivação básica para impulsionar as pesquisas é de natureza emocional, psicológica e social. Não é um processo puramente intelectual, envolve processos sociais e históricos, paixão e profundo comprometimento.

A evolução do progresso científico caminha irregularmente, com movimentos rápidos, seguidos de movimentos lentos ou pausas. As crises - dificuldades em resolver problemas - precipitam rupturas epistemológicas e o advento de novos paradigmas, como salientou Kuhn (2012).

Até agora a revolução pasteuriana não arrefeceu seu ímpeto, e continua a render frutos.

Nas últimas décadas, grande número de doenças infecciosas graves ficou sob controle, ou passível de controle, pela descoberta e aplicação em larga escala de vacinas.

Os métodos empregados seguiram basicamente a metodologia iniciada por Pasteur: descoberta do agente infeccioso, isolamento, inativação ou atenuação, formulação e aplicação da vacina.

Esse movimento da revolução pasteuriana teve outros expoentes, e segue uma progressão que, olhando retrospectivamente, parece lógica e ordenada, mas para cada

avanço houve muitos insucessos ou percalços, e não foi um movimento linear e constante.

Embora se anunciem várias novas vacinas para o futuro próximo, é possível perceber que a complexidade dos procedimentos para obtenção de novas vacinas é cada vez maior.

É possível que sejam necessários novos paradigmas, para se conseguir novos avanços, por exemplo, vacinologia reversa, em que, em vez de se partir do agente microbiano, ou de um dos seus produtos, parte-se do seu genoma (Rappuoli 2000), talvez associada a novos adjuvantes e novas formas de administração de antígenos.

Ou então, mudar o foco do micróbio para o hospedeiro, com a identificação de marcadores individuais biológicos de suscetibilidade, o uso de adjuvantes, e técnicas de manipulação genética. Esse novo caminho envolve riscos, como sempre, mas também promessas.

Para muitas doenças a melhor solução será talvez estimular a mudança comportamental, ou modificar as interações do meio ambiente com as pessoas, uma abordagem ecológica.

O mais provável é que haja uma combinação de todas essas possibilidades.

Todos os estudos aqui revisados visavam resolver graves problemas de saúde pública do Brasil e assim tiveram motivação nobre. Vários deles, especialmente os mais antigos, não formalizaram os aspectos éticos, mas a ausência de informação sobre consentimento informado, fontes de financiamento, ou conflitos de interesse, não pode levar à conclusão de que esses aspectos não tenham sido considerados. A maioria dos estudos nessa situação foi financiada e realizada por serviços públicos, portanto sem interesses comerciais.

Entretanto, é forçoso reconhecer que, ao longo do tempo, houve aprimoramento na concepção e implementação ética das pesquisas.

A contribuição das vacinas para a melhoria das condições de saúde da população brasileira é hoje incontestável. As doenças infecciosas evitáveis por vacinas estão sob controle. Os produtores nacionais de vacinas, com destaque para Bio-Manguinhos e o Instituto Butantan, tornaram possível essa conquista, e os estudos clínicos realizados no âmbito da Fiocruz viabilizaram esse processo.

O controle das doenças infecciosas permitiu maior longevidade, melhores condições de vida, aumento da produtividade e da criatividade, para milhões de pessoas em todo o mundo. Teve grande participação na redução da mortalidade de crianças e na melhoria das condições de nutrição, ao evitar o desgaste nutricional associado às doenças infecciosas, como o sarampo (Puffer & Serrano 1973b).

Por outro lado, é possível que os grandes aglomerados humanos, tornados possíveis pelas vacinações, ampliação da assistência médica, melhores condições econômicas, de saneamento e nutrição, nos reservem surpresas desagradáveis, novos desafios, que vão precisar de novas revoluções científicas ou de novas formas de vida social para serem superados.

É preciso ter uma combinação de coragem, para assumir riscos calculados e reconhecer erros, e tenacidade, para não desistir frente aos obstáculos. Tenacidade é diferente de teimosia, uma forma distorcida de amor próprio, e é preciso sabedoria para distinguir uma da outra.

Uma das lições que emerge dos estudos aqui revisados é a capacidade de reconhecer limitações e problemas e enfrentá-los. Quando Max Theiler deixou as pesquisas com a primeira vacina de febre amarela, neurotrópica, que contribuiria para desenvolver, e se dedicou a obter uma nova vacina de febre amarela mais segura, em nova e extenuante série de pesquisas, deu uma lição de humildade, espírito científico e conduta ética.

Fica claro que a inovação não é uma atividade isolada, envolve múltiplos atores que se sucedem ao longo do tempo, ou contemporâneos. O conhecimento e reflexão sobre os estudos clínicos com vacinas em sua perspectiva histórica é relevante para a compreensão dos processos envolvidos, e assim pode contribuir para ampliar perspectivas e gerar criatividade. Essa é nossa expectativa e esperança.

8. PERSPECTIVAS

Os estudos clínicos realizados no âmbito da Fundação Oswaldo Cruz foram realizados com a melhor ciência e consideração ética, levando-se em conta cada época, e são motivo justo de orgulho para a instituição e para o Brasil. Há um progresso evidente, tanto na qualidade quanto na quantidade de estudos clínicos. Esses estudos permitiram ou contribuíram para a introdução de vacinas na rede pública, subsidiaram decisões do PNI e orientaram condutas clínicas. Mesmo assim, precisamos fortalecer essa área, para podermos dar respostas adequadas e no menor tempo possível aos desafios que permanecem. Precisamos fazer mais e melhor. Por outro lado, há necessidade de fortalecer a inovação tecnológica, para que os estudos clínicos possam levar ao desenvolvimento de processos e produtos de maior valor agregado e a novas vacinas. Para esse fim, além de esforços próprios e de transferências de tecnologia, precisamos de acordos que permitam compartilhar e explorar novas tecnologias por meio de parcerias. Espero que a presente pesquisa seja uma fonte de informação útil e possa servir de estímulo para os que se dedicam à árdua tarefa de contribuir para o desenvolvimento e implementação de novas vacinas que melhorem a qualidade de vida das pessoas em todo o mundo.

9. DIFICULDADES NA ELABORAÇÃO DESSA TESE

As principais dificuldades na elaboração dessa tese referem-se à metodologia utilizada e aos critérios de inclusão dos artigos objeto da revisão. Em relação à metodologia, fizemos uma busca exaustiva e sistemática por artigos científicos que obedecessem aos critérios definidos previamente, mas sem pretensões de uma metanálise. Em relação aos critérios de inclusão, às vezes há uma área cinzenta, em que é discutível tanto a inclusão quanto a exclusão de artigos. Procurei, sempre, utilizar o bom senso, onde era impossível aplicar um rigor científico estrito.

Ouso, entretanto, afirmar, que as alternativas metodológicas fugiriam ao objetivo essencial, que é uma revisão compreensiva dos estudos clínicos no âmbito do Instituto Oswaldo Cruz e da Fiocruz, analisando os seus resultados e destacando as suas contribuições para o avanço do Programa Nacional de Imunizações do Brasil, na perspectiva do vacinologista e pesquisador clínico. Há uma ampla variedade de estudos clínicos, quer quanto aos seus objetivos quer quanto à sua metodologia. Como observamos na Discussão, o primeiro estudo randomizado e duplo cego é de 1996.

É preciso interpretar cada estudo em sua perspectiva histórica, portanto entendendo as limitações conceituais e metodológicas de cada época. Se do ponto de vista formal houve grande avanço na metodologia e ética dos estudos clínicos ao longo do tempo, do ponto de vista substantivo os estudos de maior relevância são justamente as pesquisas pioneiras com a vacina de febre amarela, onde muitos desses aspectos formais não foram atendidos.

Penso também que a experiência do autor com a implementação de vacinas nos programas de saúde pública permitiu avaliar e valorizar devidamente a contribuição dos estudos clínicos com vacinas para o extraordinário progresso no controle das doenças infecciosas, objeto do Programa Nacional de Imunizações, o PNI.

10. CONCLUSÕES

A revisão dos estudos clínicos e sua análise ao longo do tempo mostram a força e a competência da Fiocruz para realizar estudos clínicos éticos, com metodologia e fundamentos científicos de excelência, em todas as suas fases. Entretanto, o componente inovação deixa a desejar. Visando acelerar o desenvolvimento tecnológico, cuja base é a inovação, sugerimos algumas medidas. Não se deve subestimar os aspectos negativos da falta de agilidade no processo decisório e na implementação dos estudos clínicos. As janelas de oportunidades podem ser perdidas. Por outro lado, a agilidade não pode ser confundida com afoiteza e imprudência nos processos de decisão e implementação. Sugerimos:

1. Novo modelo institucional para Bio-Manguinhos/Fiocruz. É evidente que as características de serviço público ajudaram a preservar o compromisso social de Bio-Manguinhos, mas esse modelo não é competitivo, por ser lento e avesso a riscos. É preciso encontrar um novo modelo que concilie o compromisso social com a agilidade que a atividade industrial e o desenvolvimento tecnológico exigem.
2. Em relação ao item anterior, deve-se explorar a viabilidade e oportunidade de criação de subsidiária comercial para Bio-Manguinhos/Fiocruz, como uma parceria público-privada.
3. Modificação do sistema CEP/Conep, que passaria a ter atuação somente normativa, admitindo-se também sua atuação como órgão consultivo ou de recursos, quando houver conflitos ou divergências em nível local.
4. Criar um grupo de trabalho para simplificar e agilizar (“streamline”) os procedimentos burocráticos ligados à área de pesquisa, como:
 - Importação de reagentes e equipamentos
 - Contratação de pessoal
 - Acordos de cooperaçãoAssegurar o financiamento adequado dos estudos clínicos
5. Estimular o intercâmbio intra e inter-institucional, nacional e internacional.

6. Incentivar o companheirismo, a cooperação e as parcerias, por meio de reuniões, encontros e projetos conjuntos.
7. Buscar, nos acordos de parceria, além de transferência de tecnologia, compartilhamento na busca conjunta de novas tecnologias.
8. Manter e fortalecer o Seminário Científico e Tecnológico Anual de Bio-Manguinhos, com prêmios para os estudos inovadores e os jovens talentos.
9. Procurar atrair talentos, mediante a criação de um ambiente receptivo à inovação e à criação.
10. Ampliar o financiamento governamental de estudos clínicos e estimular o financiamento não governamental.
11. Estimular a rede de pesquisa clínica e apoiar as redes que já se constituíram informalmente para a realização de projetos.
12. Buscar *expertise* onde houver para a solução de problemas tecnológicos e organizacionais de Bio-Manguinhos/Fiocruz.
13. Estimular a excelência, em todos os níveis.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdulla S, Salim N, Machera F, Kamata R, Juma O, Shoman M, Kubhoja S, Mohammed A, Mwangoka G, Aebi T, Mshinda H, Schellenberg D, Carter T, Villafana T, Dubois MC, Leach A, Lievens M, Vekemans J, Cohen J, Ballou WR, Tanner M 2013. Randomized, controlled trial of the long term safety, immunogenicity and efficacy of RTS,S/AS02D malária vaccine in infants living in a malária-endemic region. *Malaria Journal* 12:11, acessado em <http://www.malariajournal.com/content/12/1/11>].
- Albuquerque YMM, Lima ALMA, Lins AK, Magalhães M, Magalhães V 2014. Quantitative real-time PCR (Q-PCR) for sputum smear diagnosis of pulmonary tuberculosis among people with HIV/AIDS. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 56:139-142.
- Anderson CR, Gast-Galvis A 1947. Immunity to yellow fever Five years after vaccination. *Am J Hyg* 45:302-304.
- Armijos RX, Weigel MM, Calvopina M, Hidalgo A, Cevallos W, Correa J 2004. Safety, immunogenicity, and efficacy of an autoclaved *Leishmania amazonensis* vaccine plus BCG adjuvant against New World cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 22:1320-1326.
- Artenstein AW 2010. Polysaccharide vaccines. In AW Artenstein, *Vaccines — a Biography*, Springer, New York, electronic edition.
- Barbosa T, Arruda S, Fernandes BD, Carvalho LP, Cardoso S, Cunha S, Barreto ML, Pereira SM, Rodrigues LC, Barral-Netto M 2003. BCG (Bacille of Calmette-Guérin) revaccination leads to improved in vitro IFN- γ response to mycobacterial antigen independent of tuberculin sensitization in Brazilian school-age children. *Vaccine* 21:2152-2160.
- Barreto ML, Pereira SM, Pilger D, Cruz AA, Cunha SS, Sant'Anna C, Ichichara MY, Genser B, Rodrigues LC 2011. Evidence of an effect of BCG revaccination on incidence of tuberculosis in school-aged children in Brazil: second report of the BCG-REVAC cluster-randomized trial. *Vaccine* 29:4875-4877.

- Bastos NCB, Carvalho Filho ES, Schatzmayr H, Homma A, Chaves J 1974. Antipoliomyelitis program in Brazil: a serologic study of immunity levels. *Bull Pan Am Health Organ* 8:54-65.
- Belsher JL, Gay P, Brinton M, Valla JD, Ridenour R, Lanciotti R, Perelygin A, Zaki S, Paddock C, Querec T, Zhu T, Pulendran B, Eidex RB, Hayes E 2007. Fatal multiorgan failure due to yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease. *Vaccine* 25:8480-9485.
- Benchimol JL 2001a. *Febre Amarela – A Doença e a Vacina, Uma História Inacabada*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 470 pp.
- Benchimol JL 2001b. *Febre Amarela – A Doença e a Vacina, Uma História Inacabada*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 195.
- Benchimol JL 2001c. *Febre Amarela – A Doença e a Vacina, Uma História Inacabada*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, p.344-350.
- Benchimol JL 2003. Adolpho Lutz: um esboço biográfico. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos* 10: 13-83.
- Bethony JM Diemert SG, Parenti D, Desrosiers A, Schuck S, Fujiwara R, Santiago H, Hotez PJ 2008. Randomized, placebo-controlled, Double-blind Trial of the Na-ASP-2 hookworm vaccine in unexposed adults. *Vaccine* 26:2408-2417.
- Biswas S, Li Y, Miura K, Zakutansky SE, Long CA, Sinden RE, Draper SJ, Hill F 2013. Enhancing antibody immunogenicity of transmission-blocking malaria vaccines. *Am J Trop Med Hyg* 89:351.
- Bloom DE, Canning D, Weston M 2005. The Value of Vaccination. *World Economics* 6:15-39.
- Boaventura AS, Ranieri TS, Bercini M, Schermann MT, Famer S, Mohrdieck R, Maraskin T, Wagner MB 2002. An evaluation of the adverse reaction potential of three measles-mumps-rubella combination vaccines. *Rev Panam Salud Publica* 1:240-246.
- Boaventura AS, Stralioto SM, Siqueira MM, Ranieri TS, Bercini M, Schermann MT, Wagner MB, Silveira TR 2006. Prevalence of antibodies against measles, mumps, and rubella before and after vaccination of school-age children with three different triple combined viral vaccines, Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Panam Salud Publica* 20:299-306.

- Camacho LAB, Klein CH 1990. Risco de infecção tuberculosa entre escolares com alta cobertura pelo BCG. *Bol Of Sanit Panam* 108:100-112.
- Camacho LA, Freire MS, Yamamura AMY, Leal ML, Mann G 2000. Estudo de soroconversão com formulações da vacina Biken CAM-70 contra sarampo. *Rev Saúde Pública* 34:358-366.
- Camacho LAB, Freire MS, Leal MLF, Aguiar SG, Nascimento JP, Iguchi T, Lozana JA, Farias RHG, e Grupo Colaborativo para o estudo das Vacinas de Febre Amarela 2004. Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17DD yellow fever vaccines: a randomized trial. *Rev Saúde Pública* 38:671-678.
- Camacho LAB, Aguiar SG, Nascimento JP, Freire MS, Leal MLF, Iguchi T, Lozana JA, Farias RHG, e Grupo Colaborativo para o estudo das Vacinas de Febre Amarela 2005. Reactogenicity of yellow fever vaccines in a randomized, placebo-controlled trial. *Rev Saúde Pública* 39:413-420.
- Campi-Azevedo AC, Araujo-Porto LP, Luiza-Silva M, Batista MA, Martins MA, Sathler-A R, Silveira-Lemos D, Camacho LAB, Martins RM, Maia MLS, Farias RHG, Freire MS, Galler R, Homma A, Ribeiro JGL, Lemos JAC, Auxiliadora-Martins M, Caldas IR, Elói-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho O 2012. 17DD and 17D-213/77 yellow fever substrains trigger a balanced cytokine profile in primary vaccinated children. *PLoS one* 7: 1-11.
- Carmo GMI, Yen C, Cortes J, Siqueira AA, Oliveira WK, Cortez-Escalante JJ, Lopman B, Flannery B, Oliveira LH, Carmo EH, Patel M 2011. Decline in Diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. *PLoS Medicine* 8:1-11.
- Carrel A 1923. A method for the physiological study of tissues in vitro. *J Exp Med* 38:407-418.
- Carvalho LJM, Pratt-Riccio LR, Daniel-Ribeiro CT 2013. Vacinas contra malária. In JR Coura, *Dinâmica das Doenças Infeciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 951-957.
- Clark HF, Offit PA, Parashar UD 2013. Rotavirus vaccines. In SA Plotkin, WA Orenstein, PA Offit. *Vaccines*, 6th ed., Saunders, electronic edition.
- Clemens SA, Azevedo T, Homma A 2003. Feasibility study of the immunogenicity and safety of a novel DTPw/Hib (PRP-T) Brazilian combination compared to a

- licensed vaccine in healthy children at 2, 4, and 6 months of age. *Rev Soc Bras Med Trop* 36:321-330.
- Cody CL, Baraff LJ, Cherry JD, Marcy SM, Manclark CR 1981. Nature and rates of adverse reactions associated with DTP and DT immunizations in infants and children. *Pediatrics* 68:650-660.
- Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine 2007. Randomized, double-blind, multicenter study of the immunogenicity and reactogenicity of 17DD and WHO 17D-213/77 yellow fever vaccines in children: implications for the Brazilian National Immunization Program. *Vaccine* 25:3118-3123.
- Conselho Nacional de Saúde 2012. Resolução nº 466 de 12 de dezembro.
- Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo 2008. *Bioética Clínica*. CREMESP, São Paulo, 266 pp.
- Costa AA, Inenami M, Juarez E, Llacén PD, Raw I 1997. Preliminary report of the use on adults of a recombinant yeast-derived hepatitis B vaccine manufactured by Instituto Butantan. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 39:39-42.
- Coura JR 2013. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*, 2ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, XXXII + 2045 pp.
- Da-Cruz AM, Pirmez C 2013. Leishmaniose tegumentar americana. In: In JR Coura, *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*, 2ª Ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 746-760.
- De Luca PM, Mayrink W, Alves CR, Coutinho SG, Oliveira MP, Bertho AL, Toledo VP, Costa CA, Genaro O, Mendonça CF 1999. Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Vaccine* 17:1179-1185.
- De Luca PM, Mayrink W, Pinto JA, Coutinho SG, Santiago MA, Toledo VP, Costa CA, Genaro O, Reis AB, Mendonça SCF 2001. A randomized double-blind placebo-controlled trial to evaluate the immunogenicity of a candidate vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Acta Trop* 80:251-260.
- Diemert DJ, Pinto AG, Freire J, Jariwala A, Santiago H, Hamilton RG, Periago MV, Loukas A, Tribolet L, Mulvenna J, Correa-Oliveira R, Hotez P, Bethony JM 2012. Generalized urticária induced by the Na-ASP-2 hookworm vaccine: Implications

- for the development of vaccines against helminths. *J Allergy Clin Immunol* 150:169-176.
- Doblas A Domingo C, Bae HG, Bohórquez CL, Ory F, Niedrig M, Mora D, Carrasco FJ, Tenorio A. Yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease and death in Spain 2006. *J Clin Virol* 36:156-158.
- Engel AR, Vasconcelos PF, McArthur MA. Barrett ADT 2006. Characterization of a viscerotropic yellow fever vaccine variant from a patient in Brazil. *Vaccine* 24:2803-2809.
- Engstrom EM, Martins RM, Leal MLM, Maia MLS, Sepúlveda CS, Camacho LAB, Leal MLM, Silveira IAF, Homma A, Jessouroun E 2012. Phase II clinical study of a Brazilian meningococcal C conjugate vaccine. XVIIIth International Pathogenic Neisseria Conference, Würzburg, Germany, p. 283 (Poster 143).
- Fernandes GC, Camacho LAB, Carvalho MS, Batista M, Almeida SMR 2007. Neurological adverse events temporally associated to mass vaccination against yellow fever in Juiz de Fora, Brazil, 1999-2005. *Vaccine* 25:3124-3128.
- Findlay GM, MacCallum FO 1937. Note on acute hepatitis and yellow fever immunization. *Tr Roy Soc Trop Med and Hyg* 31:297-300.
- Fox JP, Manso C, Penna HA, Pará M 1942. Observations on the occurrence of icterus in Brazil following vaccination against yellow fever. *Am J Hyg* 36:68-116.
- Fox JP, Lennette EH, Manso C, Aguiar JRS 1942. Encephalitis in man following vaccination with 17D yellow fever virus. *Am J Hyg* 36:117-142.
- Fox JP, Cabral AS 1943. The duration of immunity following vaccination with the 17D strain of yellow fever virus. *Am J Hyg* 37:93-120.
- Fox JP, Penna HA 1943. Behavior of 17D yellow fever virus in rhesus monkeys. *Am J Hyg* 38:152-172.
- Fox JP, Kossobudzki S L, Cunha JF 1943. Field studies on the immune response to 17D yellow fever virus. *Am J Hyg* 38:113-138.
- Fox JP, Cunha JF, Kossobudzki SL 1948. Additional observations on the duration of immunity following vaccination with the 17D strain of yellow fever virus. *Am J Hyg* 47:64-70.

- Freestone DS, Ferris RD, Weinberg AL, Kelly A 1977. Stabilized 17D strain yellow fever vaccine: dose response studies, clinical reactions and effects on hepatic function. *J Biol Stand* 5:181-186.
- Freire MS, Carvalho R, Yamamura AMY, Almeida LFC, Santos HHL, Borges MBJ, Mann GF 2002. Seroconversion following vaccination with the 17DD substrain of yellow fever virus. *Virus Reviews and Research* 7:51-56.
- Fundação Oswaldo Cruz/Bio-Manguinhos 1988. *Simpósio Internacional sobre Febre Amarela e Dengue – Cinquentenário da Introdução da Cepa 17 D no Brasil*. Ministério da Saúde, 470 pp.
- Fundação Oswaldo Cruz, Casa de Oswaldo Cruz 1991. *Memória de Manguinhos. Acervo de Depoimentos*. Fundação Oswaldo Cruz, Casa de Oswaldo Cruz, 120 pp.
- Fundação Oswaldo Cruz, Casa de Oswaldo Cruz 2001. *Fundo Instituto Oswaldo Cruz: inventário dos documentos das coleções científicas*. Departamento de Arquivo e Documentação, 123 pp.
- Fundação Oswaldo Cruz/Casa de Oswaldo Cruz. Departamento de Arquivo e Documentação 2009. *Guia do Acervo da Casa de Oswaldo Cruz, 2ª Ed.*, 150 pp.
- Galler R, Pugachev KV, Santos CLS, Ocran SW, Jabor AV, Rodrigues SG, Marchevsky RS, Freire MS, Almeida LFC, Cruz ACR, Yamamura AMY, Rocco IM, Rosa EST, Souza LTM, Vasconcelos PF, Guirakhoo F, Monath TP 2001. Phenotypic and molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil. *Virology* 290:309-319.
- Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Bryan J, Taddeo FJ, Railkar R, Esser MT, Sings HL, Nelson M, Boslego J, Sattler C, Barr E, Koutsky LA; Females United to Unilaterally Reduce Endo/Ectocervical Disease (FUTURE) I Investigators 2007. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Eng J Med* 356:1928-1943.
- Gershman MD, Staples JE, Bentsi-Enchill AD, Breugelmans JG, Brito GS, Camacho LAB, Cottin P, Domingo C, Durbin A, Gascon J, Guenaneche F, Hayes EB, Jelenik Z, Khromava A, Martins RM, Wilson MM, Massy N, Nasidi A, Niedrig M, Sherwat A, Tsai T, Vilella A, Wilson ME, Kohl KS, The Brighton Collaboration

- Viscerotropic Disease Working Group 2012. Viscerotropic disease: Case definition and guidelines for collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine* 30:5038-5058.
- Giuliano AR, Palefsky JM, Goldstone S, Moreira Jr ED, Penny ME, Aranda C, Vardas E, Moi H, Jessen H, Hillman R, Chang Y, Ferris D, Rouleau D, Bryan J, Marshall JB, Vuocolo S, Barra E, Radley D, Haupt RM, Guris D 2011. Efficacy of quadrivalent HPV vaccine against HPV infection and disease in males. *New Eng J Med* 354:401-411.
- Global Advisory Committee on Vaccine Safety 2013. *Week Epidemiol Rec* 88:301-312.
- Groot H, Ribeiro RB 1962. Neutralizing and haemagglutination-inhibiting antibodies to yellow fever 17 years after vaccination with 17D vaccine. *Bull Wld Hlth Org* 27:699-707.
- Grupo Colaborativo do Programa Nacional de Imunizações para o Estudo da Soroconversão pela Vacina Contra a Febre Amarela, 2003. *Estudo multicêntrico de soroconversão pela vacina de febre amarela*. In: CSCS, editor. VII Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva.
- Heidelberger M, Avery OT 1923. The soluble specific substance of pneumococcus. *J Exp Med* 38:73-79.
- Heidelberger M, Avery OT 1924. The soluble specific substance of pneumococcus: second paper. *J Exp Med* 40:301-317.
- Hillman RJ, Giuliano AR, Palefsky JM, Goldstone S, Moreira Jr ED, Vardas E, Aranda C, Jessen H, Ferris DG, Coutlee F, Marshall J B, Vuocolo S, Haupt RM, Guris D, Garner EIO 2012. Immunogenicity of the quadrivalent human papillomavirus (type 6/11/16/18) vaccine in males 16 to 26 years old. *Clin Vacc Immunol* 19:261-267.
- Ioshimoto LM, Rissato ML, Bonilha VSJ, Miyaki C, Raw I, Granowski N 1999. Safety and immunogenicity of hepatitis B vaccine Butang in adults. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 41:191-193.
- Kaufmann SHE, Rouse BT, Sacks DL 2011. *The Immune Response to Infection*. ASM Press, Washington, XV + 666 pp.
- Kuhn TS 2012. *The Structure of Scientific Revolutions*, electronic edition. University of Chicago Press, USA, sem indicação do número de páginas.

- Landsteiner K 1990. *The specificity of serological reactions*. Revised ed. Dover Publications, New York, 348pp.
- Lenzi HL, Vannier-Santos MA 2013. Interface parasito-hospedeiro coabitologia: uma visão diferente do fenômeno parasitismo. In JR Coura, *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*, 2ª Ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 34-81.
- Lindgren-Alves CR, Freire LMS, Oliveira RC, Guerra HL, Da-Silva EE, Siqueira MM, Horta IM, Queiroz CC 2001. Pesquisa de anticorpos contra o sarampo em crianças infectadas pelo HIV, após imunização básica. *Jornal de Pediatria* 77:496-502
- Lloyd W, Theiler M, Ricci NI 1936. Modification of the virulence of yellow fever vírus by cultivation in tissues in vitro. *Tr Roy Soc Trop Med & Hyg* 29:481-529.
- Lopes OS, Guimarães SSDA, Carvalho R 1987. Studies on yellow fever vaccine I – quality control parameters. *J Biol Stand* 15:323-329.
- Lopes OS, Guimarães SSDA, Carvalho R 1988a. Studies on yellow fever vaccine II – stability of the reconstituted vaccine. *J Biol Stand* 16:71-76.
- Lopes OS, Guimarães SSDA, Carvalho R 1988b. Studies on yellow fever vaccine III – dose response in volunteers. *J Biol Stand* 16:77-82.
- Luiza-Silva M, Campi-Azevedo AC, Batista MA, Martins MA, Avelar RS, Lemos DS, Camacho LAB, Martins RM, Maia MLS, Farias RHG, Freire MS, Galler R, Homma A, Ribeiro JGL, Lemos JAC, Martins MA, Eloi-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA 2011a. Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody. *J Infect Dis* 204:873-883.
- Luiza-Silva M, Martins MA, Espírito-Santo L R, Campi-Azevedo AC, Silveira-Lemos D, Ribeiro JGL, Homma A, Kroon EG, Teixeira-Carvalho A, Eloi-Santos SM, Martins-Filho OA 2011b. Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. *Vaccine* 29:583-592.
- Luna EJ, Moraes JC, Silveira L, Salina HSN 2009. Efficacy and safety of the Brazilian vaccine against Hepatitis B in newborns. *Rev Saúde Pública* 43:1-6.
- Machado-Pinto J, Pinto J, da Costa CA, Genaro O, Marques MJ, Modabber F, Mayrink W 2002. Immunotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial

- using killed *Leishmania amazonensis* vaccine plus antimonial. *Int J Dermatol* 41:73-78.
- Marchevsky RS, Leal ML, Homma A, Coutinho ESF, Camacho LAB, Jabor AV, Galler R, Freire MS 2006. Molecular and phenotypic analysis of a working seed lot of yellow fever virus 17DD vaccine strain produced from the secondary seed lot 102/84 with an additional passage in chicken embryos. *Biologicals* 34:191-197.
- Martin M, Tsai TF, Cropp B, Chang GJ, Holmes Da, Tseng J, Shieh W, Zaki SR, Al-Sanuri I, Cutrona AF, Ray G, Weld LH, Cetron MS 2001. Fever and multisystem organ failure associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of four cases. *Lancet* 358:98-104.
- Martínez MJ, Vilella A, Pumarola T, Roldan M, Sequera VG, Vera I, Hayes EB 2011. Persistence of yellow fever vaccine RNA in urine. *Vaccine* 29:3374-3376.
- Martins MA, Silva ML, Marciano APV, Peruhype-Magalhães V, Eloi-Santos SM, Ribeiro JGL, Correa-Oliveira R, Homma A, Kroon EG, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA 2007. Activation/Modulation of adaptive immunity emerges simultaneously after 17DD yellow fever first-time vaccination: is this the key to prevent severe adverse reactions following immunization? *Clin Exp Immunol* 148:90-100.
- Martins MA, Silva ML, Elói-Santos SM, Ribeiro JGL, Peruhype-Magalhães V, Marciano APV, Homma A, Kroon EG, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA 2008. Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination. *Vaccine* 26:1173-1184.
- Martins RM, Bensabath G, Arraes LC, Oliveira MLA, Miguel JC, Barbosa GG, Camacho LAB 2004. Multicenter study on the immunogenicity and safety of two recombinant vaccines against hepatitis B. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99:865-871.
- Martins RM, Camacho LAB, Lemos MCF, Noronha TG, Carvalho MHC, Greffe N, Silva MM, Périssé AR, Maia MLS, Homma A 2007. Incidence of hypotonic-hyporesponsive episodes associated to the combined DTP/Hib vaccine used in Brazilian National Immunizations Program. *J Pediatr (Rio J)* 83:523-528].
- Martins RM, Camacho LAB, Marcovitz R, Noronha TG, Maia MLS, Santos EM, Barbosa GG, Silva AMV, Souza PCNF, Lemos MCF, Homma A 2008. Immunogenicity,

- reactogenicity and consistency of production of a Brazilian combined vaccine against diphtheria, tetanus, pertussis and *Haemophilus influenzae* type b. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:711-718.
- Martins RM, Périssé ARS, Camacho LAB, Santos TM, Silveira IAFB, Leal ML, Maia MLS, Homma A, Jessouroun E 2009a. Phase I safety and immunogenicity study of a Brazilian bivalent serogroup B vaccine. *Vaccin Monitor* 18:40.
- Martins RM, Périssé ARS, Camacho LAB, Santos TM, Silveira IAFB, Leal ML, Marcovistz R, Maia MLS, Homma A, Jessouroun E 2009b. Phase I safety and immunogenicity study of a serogroup C conjugate vaccine: lessons learned. *Vaccin Monitor* 18:41 (Poster B-9).
- Martins RM, Barbosa GG, Maia MLS, Engstrom E, Camacho LAB, Périssé ARS, Silveira IAFB, Leal ML, Marcovistz R, Homma A, Jessouroun E 2010a. Phase I study of a meningococcal C strain 2135 conjugate vaccine. 17th International Pathogenic *Neisseria* Conference, Banff, Canada, p. 169 (Poster P184).
- Martins RM, Maia MLS, Santos EM, Cruz RLS, Santos PRG, Carvalho SMD, Sato HK, Schermann MT, Mohrdieck R, Leal MLF, Homma A 2010b. Yellow fever vaccine post-marketing surveillance in Brazil. *Procedia Vaccinol* 2:178-183.
- Martins RM, Homma A, Migowski E 2013a. Imunizações In JR Coura, *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 431-443.
- Martins RM, Maia MLS, Farias RHG, Camacho LAB, Freire MS, Galler R, Yamamura AMY, Almeida LFC, Lima SMB, Nogueira RMR, Sá GRS, Hokama DA, Carvalho R, Freire RAV, Pereira Filho E, Leal MLF, Homma A 2013b. 17DD yellow fever vaccine. A Double blind, randomized clinical trial of immunogenicity and safety on a dose-response study. *Hum Vaccin Immunother* 9:1-10.
- Martins RM, Homma A 2014. Há necessidade de doses de reforço para a vacina febre amarela? In G Levi, HIG Giamberardino, Kfour R, *Controvérsias em imunizações 2013*, São Paulo, Segmento Farma, p. 19-31.
- Marzochi KBF, Marzochi MCA, Silva AF, Grativol N, Duarte R, Confort EM, Modabber F 1998. Phase 1 study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93:205-212.

- Mascarenhas JDP, Linhares AC, Gabbay YB, Leite JPG 2002a. Detection and characterization of rotavirus G and P types from children participating in a rotavirus vaccine trial in Belém, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97:113-117.
- Mascarenhas JDP, Leite JPG, Gabbay YB, Freitas RB, Oliveira CS, Monteiro TAF, Linhares AC, 2002b. Rotavirus G serotypes and P[8],G genotypes identified in cases of reinfection among children participating in a trial with rhesus-human reassortant tetravalent vaccine (RRV-TV) in Belém, Brazil. *J Trop Ped* 2002; 48:93-97.
- Mason RA, Tauraso NM, Spertzel RO, Ginn RK 1973. Yellow fever vaccine: direct challenge of monkeys given graded doses of 17D vaccine. *Appl Microbiol* 25:539-544.
- Matos DCS, Silva AMV, Neves PCC, Martins RM, Homma A, Marcovistz R 2009. Pattern of functional antibody activity against *Haemophilus influenzae* type b (Hib) in infants immunized with diphtheria-tetanus-pertussis/Hib Brazilian combination vaccine. *Braz J Med Biol Res* 42:1242-1247.
- McMahon AW, Eidex RB, Marfin AA, Russell M, Sejvar JJ, Markoff L, Hayes EB, Chen RT, Ball R, Braun MM, Cetron M and the Yellow Fever Working Group 2007. Neurologic disease associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of 15 cases. *Vaccine* 25:1727-1734.
- Melo AB, Silva MPC, Magalhães MCF, Gil LHV, Carvalho EM F, Braga-Neto UM, Bertani GR, Marques Jr ETA, Cordeiro MT 2011. Description of a Prospective 17DD yellow fever vaccine cohort in Recife, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 85:739-747.
- Melo AB, Nascimento EJM, Braga-Neto U, Dhalia R, Silva AM, Oelke M, Schneck JP, Sidney J, Sette A, Montenegro SML, Marques ET 2013. T-cell memory responses elicited by yellow fever vaccine are targeted to overlapping epitopes containing multiple HLA-I and –II binding motifs. *PLoS Negl Trop Dis* 7:1-11.
- Mendonça SCF, De Luca PM, Mayrink W, Restom TG, Conceicao-Silva F, Da-Cruz AM, Bertho AL, Costa CA, Genaro O, Toledo VPCP, Coutinho SG 1995. Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 53:195-201.

- Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde 2000. *Eventos adversos sérios associados com a vacina de febre amarela*, Ministério da Saúde, Brasília, 23 pp.
- Ministério da Saúde 1998. *Manual de vigilância epidemiológica de eventos adversos pós-vacinação*, Fundação Nacional de Saúde, Brasília, 102 pp.
- Ministério da Saúde 2001. *Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais*, Fundação Nacional de Saúde, Brasília, 142 pp.
- Ministério da Saúde 2002a. *Recomendações para imunização ativa e passiva de doentes com neoplasias*, Fundação Nacional de Saúde, Brasília, 27 pp.
- Ministério da Saúde 2002b. *Recomendações para vacinação em pessoas infectadas pelo HIV*, Fundação Nacional de Saúde, Brasília, 18pp.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica 2013. *Programa Nacional de Imunizações*. Ministério da Saúde, Brasília, 236 pp.
- Monath TP 2009. Yellow fever. In AA Artenstein, *Vaccines – A Biography*. Springer, New York, electronic edition.
- Monath TP 2011. Yellow fever vaccines: the success of empiricism, pitfalls of application, and transition to molecular vaccinology. In SA Plotkin, *History of Vaccine Development*, Springer, New York, p. 109-135.
- Monath TP, Gershman M, Staples JE, Barrett ADT, 2013. Yellow fever. In SA Plotkin, WA Orenstein, PA Offit. *Vaccines*, 6th ed., Saunders, electronic edition.
- Moreira Jr ED, Palefsky JM, Giuliano AR, Goldstone S, Aranda C, Jessen H, Hillman RJ, Ferris D, Coutlee F, Vardas E, Marshall J B, Vuocolo S, Haupt RM, Guris D, Garner EIO 2011. Safety and reactogenicity of a quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) L1 viral-like-particle vaccine in older adolescents and young adults. *Human Vaccines* 7:768-775.
- Moraes JC, Luna EJA, Grimaldi RA 2010. Immunogenicity of the Brazilian hepatitis B vaccine in adults. *Rev Saúde Pública* 44:1-5.
- Motta MSF, Mussi-Pinhata MM, Jorge SM, Yoshida CFT, Souza CBS 2002. Immunogenicity of hepatitis B vaccine in preterm and full term infants vaccinated within the first week of life. *Vaccine* 20:1557-1562.

- Motta-Castro ARC, Gomes SA, Yoshida CFT, Miguel JC, Teles SA, Martins RMB 2009. Compliance with and response to hepatitis B vaccination in remaining quilombo communities in Central Brazil. *Cad Saude Pública* 25:738-742.
- Nascimento E, Fernandes DF, Vieira EP, Campos-Neto A, Ashman JA, Alves FP, Coler RN, Bogatzki LY, Kahn SJ, Beckmann AM, Pine SO, Cowgill KD, Reed SG, Piazza FM 2010. A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine when used in combination with meglumine antimoniate for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 28:6581-6587.
- Nascimento DR 2011. As campanhas de vacinação contra a poliomielite no Brasil (1960-1990). *Cien Saude Colet* 16:501-511.
- Neves PCC, Matos DCS, Marcovitz R, Galler R 2009. TLR expression and NK activation after human yellow fever vaccination. *Vaccine* 27:5543-5549.
- Nicolau AR 1988. Produção da vacina anti-amarílica no Brasil . In Ministério da Saúde. *Simpósio Internacional sobre Febre Amarela e Dengue. Cinquentenário da Introdução da cepa 17D no Brasil*. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, p 168-169.
- Noazim S, Modabber F, Khamesipour A, Smith PG, Moulton LH, Nasser K, Sharifi I, Khalil EAG, Bernal IDV, Antunes CMF, Kieny MP, Tanner M 2008. First generation leishmaniasis vaccines: a review of field efficacy trials. *Vaccine* 26:6759-6767.
- Nohynek H, Jokinen J, Partinen M, Vaarala O, Kirjavainen T, Sundman J, Himanen S, Hublin C, Julkunen I, Olsén P, Saarenpää-Heikkilä O, Kilpi T 2012. ASO3 adjuvanted AH1N1 vaccine associated with an abrupt increase in the incidence of childhood narcolepsy in Finland. *PLoS One* 7:1-9, e33536.
- Offit PA, DeStefano F 2013. Vaccine safety. In SA Plotkin, WA Orenstein, PA Offit. *Vaccines*, 6th ed., Saunders, electronic edition.
- Oliva OP, Chaves JRS, Loureiro MLP, Pereira LA, Homma A 1986. Vacina CAM-70 contra o sarampo, produzida no Brasil. Avaliações de campo em crianças com 6-12 meses de idade. *Boletim Epidemiológico, ano XVIII nº 21/26*, Ministério da Saúde, Fundação SESP pp. 121-129.

- Oliveira ES, Marinho JM, Barbosa T 2013. Interferon-gamma Production by mononuclear cells in Bacille Calmette-Guérin-revaccinated healthy volunteers predicted long-term antimycobacterial responses in a randomized controlled trial. *Vaccine* 31:3778-3782.
- Organização Pan-Americana da Saúde, 2005. *Documento das Américas*. Organização Pan-Americana da Saúde, 88 pp.
- Palefsky JM, Giuliano AR, Goldstone S, Moreira Jr ED, Aranda C, Jessen H, Hillman R, Ferris D, Coutlee F, Stoler MH, Marshall J B, Radley D, Vuocolo S, Haupt RM, Guris D, Garner EIO 2011. HPV vaccine against anal HPV infection and anal intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med* 365:1576-1585.
- Patel MM, López-Collada VR, Bulhões MM, Oliveira LH, Márquez AB, Flannery B, Esparza-Aguilar M, Renoier EIM, Luna-Cruz ME, Sato HK, Hernández-Hernández LC, Toledo-Cortina G, Cerón-Rodríguez M, Osnaya-Romero N, Martínez-Alcazar M, Aguinaga-Villasenor RG, Plascencia-Hernández A, Fojaco-Gonzalez F, Rezk GH, Gutierrez-Ramírez SF, Dorame-Castillo R, Tinajero-Pizano R, Mercado-Villegas B, Barbosa MR, Maluf EMC, Ferreira LB, Carvalho FM, Santos AR, Cesar ED, Oliveira MEP, Silva CLO, Cortes MA, Matus CR, Tate J, Gargiullo P, Parashar UD 2011. Intussusception risk and health benefits of rotavirus vaccination in Mexico and Brazil. *N Eng J Med* 364:2283-2292.
- Patriarca PA, Palmeira G, Lima Filho J, Cordeiro MT, Laender F, Oliveira MJC, Dantes MCS, Risi Jr JB 1988. Randomised Trial of alternative formulations of oral poliovaccine in Brazil. *Lancet* 27:429-432.
- Penna HA 1934. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil-Médico* 48, 949-950.
- Penna HA 1939. New technique for aseptic removal of chick embryo from egg. *Amer J Trop Med Hyg* s1,19:589-592.
- Plotkin SA 2011. *History of Vaccine Development*. Springer, New York, 349 pp.
- Post PR, Carvalho R, Freire MS, Galler R 2001. The early use of yellow fever virus strain 17D for vaccine production in Brazil – a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96:849-857.
- Potsch DV, Oliveira MLA, Ginuino C, Miguel JC, Oliveira SAN, Silva EF, Moreira RB, Cruz GVM, Oliveira ALVSM, Camacho LAB, Barroso PF 2010. High rates of serological

- response to a modified hepatitis B vaccination schedule in HIV-infected subjects. *Vaccine* 28:1447-1450.
- Potsch DV, Camacho LAB, Tuboi S, Villar LM, Miguel JC, Ginuino C, Silva EF, Mendonça RMM, Moreira RB, Barroso PF 2012. Vaccination against hepatitis B with 4-double doses increases response rates and antibodies titers in HIV-infected adults. *Vaccine* 30:5973-5977.
- Puffer RR, Serrano CV 1973a. La deficiencia nutricional y la mortalidad em la niñez. *Bol Of Sanit Panam* 75:1-30.
- Puffer RR, Serrano CV 1973b. *Características de la mortalidad em la niñez. Informe de la Investigación Interamericana de Mortalidad em la niñez*. OPAS, Publicación Científica nº 262, Washington, 490 pp.
- Pulendran B, Miller J, Querec TD, Akondy R, Moseley N, Laur O, Glidewell J, Monson N, Zhu T, Zhu H, Staprans S, Lee D, Brinton MA, Perelygin AA, Vellozi C, Brachmann Jr P, Lalor S, Teuwen D, Eidex RB, Cetron M, Priddy F, del Rio C, Altman J, Ahmed R 2008. Case of yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease with prolonged viremia, robust adaptive immune responses, and polymorphisms in CCR5 and RANTES genes. *J Infect Dis* 198:500-507.
- Rappuoli R 2000. Reverse vaccinology. *Current opinion microbiol* 3:445-450.
- Rego S, Palácios M, Siqueira-Batista R 2009. *Bioética para Profissionais de Saúde*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 160 pp.
- Santini-Oliveira M, Camacho LAB, Souza TML, Luz PM, Vasconcellos MTL, Giacoia-Gripp CBW, Morgado MG, Nunes EP, Lemos AS, Ferreira ACG, Moreira RI, Veloso VG, Siqueira MM, Grinsztejn B 2012. H1N1pdm09 adjuvanted vaccination in HIV-infected adults: a randomized trial of two single versus two double doses. *PLoS One* 7:1-11.
- Santos AP, Bertho AL, Dias DC, Santos JR, Marcovistz R 2005. Lymphocyte subset analyses in healthy adults vaccinated with yellow fever 17DD virus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100:331-337.
- Santos AP, Bertho AL, Martins RM, Marcovistz R 2007. The sample processing time interval as an influential fator in flow cytometry analysis of lymphocyte subsets. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102:117-120.

- Santos AP, Matos DCS, Bertho AL, Mendonça SCF, Marcovistz R 2008. Detection of TH1/ TH2 cytokine signatures in yellow fever 17DD first-time vaccinees through ELISpot assay. *Cytokine* 42:152-155.
- Santos DM, Carneiro MW, de Moura TR, Soto M, Luz NF, Prates DB, Irache JM, Brodskyn C, Barral A, Barral-Netto M, Espuelas S, Borges VM, de Oliveira CI 2013. PLGA nanoparticles loaded with KMP-11 stimulate innate immunity and induce the killing of Leishmania. *Nanomedicine* 9:985-995.
- Sawyer WA, Kitchen SF, Lloyd W 1932. Vaccination against yellow fever with immune serum and virus fixed for mice. *J Exp Med* 55:945-969.
- Schatzmayr HG, Homma A 1969. Avaliação sorológica da vacina oral, tipo Sabin, contra a poliomielite, em região semi-rural: I. Formação de anticorpos em vacinados. *Rev Soc Bras Med Trop* 3:317-322.
- Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Bermudez JAZ, Pinhão AT, Queiroz B, Venâncio LR, Assis CER, Shiraiwa T 1982. Serological response to measles vaccine (Schwarz strain) in a low-income population at Rio de Janeiro. *Rev. Microbiol. São Paulo* 13 (3):242-243.
- Schatzmayr HG, Maurice Y, Fujita M, Fillippis AMB 1986. Serological evaluation of poliomyelitis oral and inactivated vaccines in an urban low-income population at Rio de Janeiro, Brazil. *Vaccine* 4:111-113.
- Schatzmayr HG, de Filippis AMB, Friedrich F 2002. Erradicação da poliomielite: a contribuição da Fundação Oswaldo Cruz. *História Ciências, Saúde* 9:11-24.
- Schramm FR, Rego S, Braz M, Palácios M 2005. *Bioética*. Editora UFRJ/Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 256 pp.
- Seligman SJ 2011. Yellow fever virus vaccine-associated deaths in young women. *Emerg Infect Dis* 17:1891-1893.
- Silva JRN, Camacho LAB, Siqueira MM, Freire M, Castro YP, Maia MLS, Yamamura AMY, Martins RM, Leal MLF, e Grupo Colaborativo para o Estudo das Vacinas de Febre Amarela 2011. Mutual interference on the immune response to yellow fever vaccine and a combined vaccine against measles, mumps and rubella. *Vaccine* 29:6327-6334.
- Silva ML, Espirito-Santo LR, Martins MA, Silveira-Lemos D, Peruhype-Magalhães V, Caminha RC, Maranhão-Filho PA, Auxiliadora-Martins M, Martins RM, Galler R,

- Freire MS, Marcovistz R, Homma A, Teuwen D, Elói-Santos SM, Andrade MC, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA 2010. Clinical and immunological insights on severe, adverse neurotropic and viscerotropic disease following 17D yellow fever vaccination. *Clin Vacc Immunol* 17:1, 118-126.
- Smith HH, Penna HA, Paoliello A 1938. Yellow fever vaccination with cultured virus (17D) without immune serum. *Am J Trop Med Hyg* 18:437-468.
- Smith CEG, Turner LH, Armitage P 1962. Yellow fever vaccination in Malaya by subcutaneous injection and multiple puncture. *Bull Org Mond Santé* 27:717-727.
- Smithburn KC, Mahaffy AF 1945. Immunization against yellow fever. Studies on time of development and duration of induced immunity. *Am J Trop Med* 25:217-223.
- Soper FL, Smith HH 1938. Yellow fever vaccination with cultivated virus and immune and hyperimmune serum. *Am J Trop Med s1* 18:111-134.
- Stefano I, Sato HK, Pannuti CS, Omoto TM, Mann G, Freire MS, Yamamura AMY, Vasconcelos PFC, Oselka GW, Weckx LW, Salgado MF, Noale LFO, Souza VAUF 1999. Recent immunization against measles does not interfere with the sero-response to yellow fever vaccine. *Vaccine* 17:1042-1046.
- Stock NK, Boschetti N, Herzog C, Appelhans MS, Niedrig M 2012. The phylogeny of yellow fever virus 17D vaccines. *Vaccine* 30: 989-994.
- Stockdale L, Newton R 2013. A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. *PLoS Negl Trop Dis* 7:1-15.
- Stokes A, Bauer JH, Hudson NP 1928. Experimental transmission of yellow fever to laboratory animals. *Am J Trop Med Hyg* 8:103-164.
- Struchiner CJ, Luz PM, Dourado I, Sato HK, Aguiar SG, Ribeiro JGL, Soares RCR, Codeço C 2004. Risk of fatal adverse events with 17DD yellow fever vaccine. *Epidemiol Infect* 132:939-946.
- Suárez-Mutis MC, Martínez-Espinosa FE, Albuquerque BC 2013. Malária. In JR Coura, *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 887-889.
- Ten Dam HG, Hitze KL 1980. Determining the prevalence of tuberculosis infection in populations with non-specific tuberculin sensitivity. *Bull WHO* 58:475-483, 1980.

- The Future II study group 2007. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N Eng J Med* 356:1915-1927.
- Theiler M 1930a. Susceptibility of white mice to the virus of yellow fever. *Science* 71:1840.
- Theiler M 1930b. Studies on the action of yellow fever virus in mice. *Ann Trop Med & Parasitol* 24:249-272.
- Theiler M, Smith HH 1937a. The effect of prolonged cultivation in vitro upon the pathogenicity of yellow fever virus. *J Exp Med* 65:767-786.
- Theiler M, Smith HH 1937b. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. *J Exp Med* 65:787-800.
- Thomas RE, Lorenzetti DL, Spragins W, Jackson D, Williamson T 2012. The safety of yellow fever vaccine 17D or 17DD in children, pregnant women, HIV+ individuals and older persons: systematic review. *Am J Trop Med Hyg* 86:359-372.
- Urdaneta M, Prata A, Struchiner CJ, Tosta CE, Tauil P, Boulos M 1996. Safety evaluation of SPf66 malária vaccine in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 29:497-501.
- Urdaneta M, Prata A, Struchiner CJ, Tosta CE, Tauil P, Boulos M 1998. Evaluation of SPf66 malaria vaccine efficacy in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 58:378-385.
- Vasconcelos PF, Luna EJ, Galler R, Silva LJ, Coimbra TL, Barros VLRS, Monath TP, Rodrigues SG, Laval C, Costa ZG, Vilela MFG, Santos CLS, Papaioordanou CMO, Alves VAF, Andrade LD, Sato HK, Rosa EST, Froguas GB, Lacava E, Almeida LMR, Cruz ACR, Rocco IM, Santos RTM, Oliva OFP, and the Brazilian Yellow Fever Vaccine Evaluation Group 2001. Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases. *Lancet* 358:91-97.
- Wheelock EF, Sibley WA 1965. Circulating virus, interferon and antibody after vaccination with the 17-D strain of yellow fever virus. *N Engl J Med* 273 (SV):195-198.
- Whittembury A, Ramirez G, Hernandez H, Ropero AM, Waterman S, Ticona M, Brinton M, Uchuya J, Gershman M, Toledo W, Staples E, Campos C, Martínez M, Chang GJ, Cabezas C, Lanciotti R, Zaki S, Montgomery JM, Monath T, Hayes E 2009.

Viscerotropic disease following yellow fever vaccination in Peru. *Vaccine* 27:5974-5981.

WHO. *International Standards for Clinical Trial Registries*. WHO, 2012, 48 pp.

Woodruff AM, Goodpasture EW 1931. The susceptibility of the chorio-allantoic membrane of chick embryos to infection with the fowl-pox virus. *Am J Pathol* 7:209-222.

WHO 2013. Vaccines and vaccination against yellow fever. WHO Position Paper – June 2013. *Wkly Epidemiol Rec* 88:269-284.

12. GALERIA DE FOTOS

Numa revisão em que o papel das instituições é posto em relevo, considerarei justo homenagear os seus dirigentes ao longo da história, pois de alguma forma os mesmos participaram ou deram suporte às pesquisas aqui relatadas e analisadas e representam toda a comunidade de profissionais envolvida com os estudos.

Diretores de Bio-Manguinhos



Akira Homma, maio/1976 a abril/1989 e julho/2001 a maio/2009



Otávio Francisco Pinheiro Oliva | abril/1989 – janeiro/1994 |



João Luiz de San Tiago D. B. Quental | janeiro/1994 a dezembro/1997 |



**Maria da Luz Fernandes Leal | dezembro/1997
a março/1999 |**



Marcos Henrique de Castro Oliveira | março/1999 a julho/2001 |



Artur Roberto Couto, 2009 -

Presidentes da Fiocruz



Oswaldo Cruz Filho, 1970 a 1972



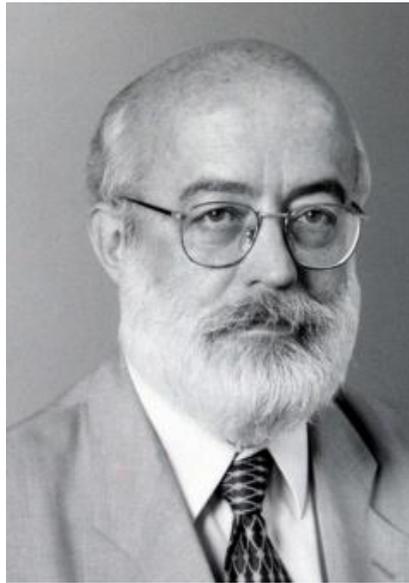
Oswaldo Lopes da Costa, 1972 a 1975



Vinicius Fonseca, 1975 a 1979



Guillardio Martins Alves, 1979 a 1985



Antonio Sérgio da Silva Arouca, 1985 a 1989



Akira Homma, 1989 a 1990



Luís Fernando da Rocha Ferreira, 1990



Hermann Gonçalves Schatzmayr, 1990 a 1992



Euclides Ayres de Castilho, 1992

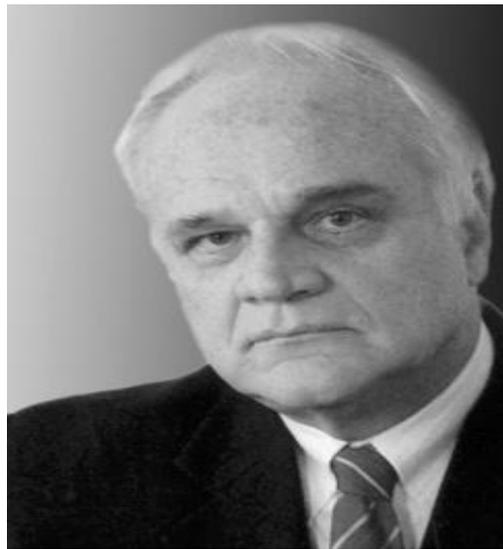


Carlos Médicis Morel,

1992 a 1997



Elói de Souza Garcia, 1997 a 2000

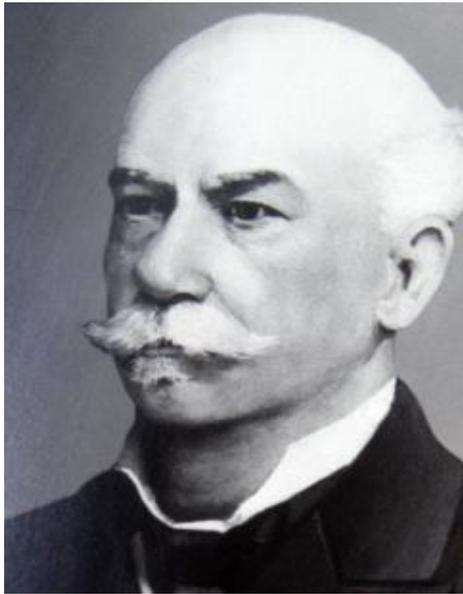


Paulo Marchiori Buss, 2000 a 2008



Paulo Gadelha, 2008 –

Diretores do Instituto Oswaldo Cruz



Barão de Pedro Afonso, 1900-1902



Oswaldo Gonçalves Cruz, 1908 a 1917



Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, 1917 a 1934



Antonio Cardoso Fontes, 1934 a 1942



Henrique de Beaurepaire Aragão, 1942 a 1949



Olympio da Fonseca Filho, 1949 a 1953



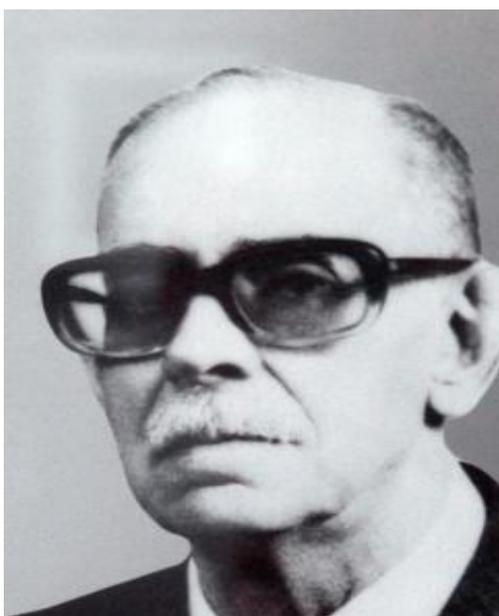
Cássio Miranda, 1953 a 1954



Francisco da Silva Laranja Filho, 1954 a 1955



Antonio Augusto Xavier, 1955 a 1958



Amilcar Vianna Martins, 1958 a 1960



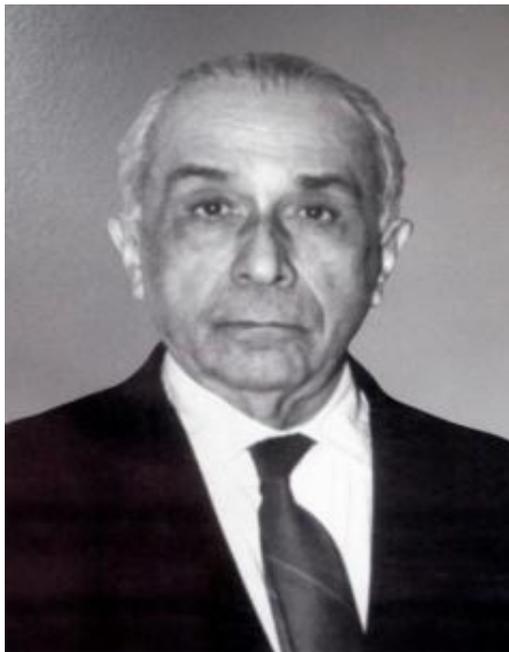
Tito Arcoverde Cavalcanti, 1960 a 1961



Joaquim Travassos da Rosa, 1961 a 1964



Francisco de Paula Rocha Lagoa, 1964 a 1969



José Guilherme Lacorte, 1971 a 1975



Felipe Néri Guimarães, 1975



Gernard Carneiro da Cunha Nóbrega, 1975 a 1976



Wladimir Lobato Paraense, 1976 a 1979



José Rodrigues Coura, 1979 a 1985 e 1997 a 2001



Carlos Médicis Morel, 1985 a 1989

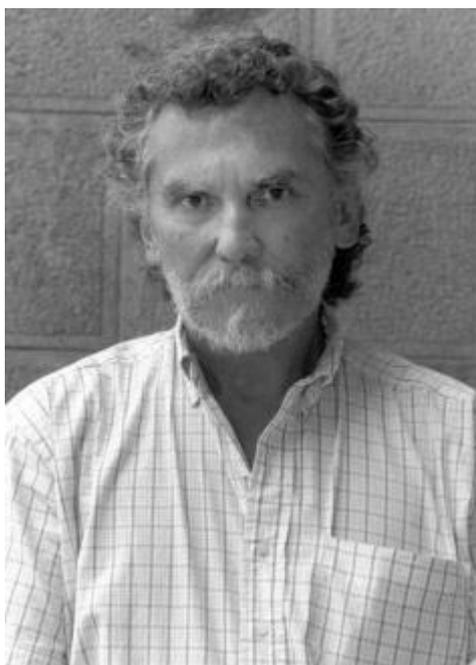


Sergio Gomes Coutinho, 1989 a 1993



Claudio Tadeu Daniel Ribeiro

1993 a 1995



Renato Sergio Balão Cordeiro, 2001 a 2005



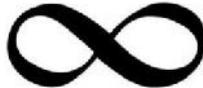
Tania Cremonini de Araujo Jorge, 2005 a 2009 e 2009 a 2013



**Wilson Savino, à esquerda, 2013 –
À direita, Paulo Gadelha, Presidente da Fiocruz**



Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz

25 de maio de 1900 → 

Anexo

Estudos com vacinas em que participei como primeiro autor

