

# HEPATITE B

**Nikolai Granovski**

Assessor técnico-científico do Instituto Butantan, Presidente da N.G.Biotecnologia Ltda, São Paulo-SP.

**Luzia Mitie Ioshimoto**

Pesquisadora do Instituto Butantan, São Paulo-SP.

Fotos cedidas pelos autores

## SITUAÇÃO ATUAL E PERSPECTIVAS PARA O CONTROLE DA HEPATITE B NO BRASIL

### Introdução

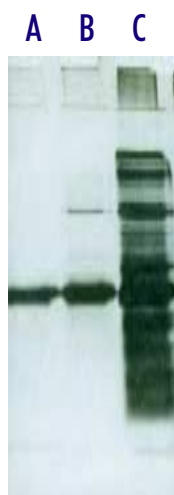
O progresso acelerado na área de Biologia Molecular, particularmente em relação ao conhecimento da resposta imune e da tecnologia do DNA recombinante, tem possibilitado o desenvolvimento de vacinas eficazes e muito mais seguras. Um dos melhores exemplos, é representado pela vacina recombinante contra a hepatite B, considerada totalmente segura pelo “FDA”, após a aplicação de mais de 12 milhões de doses em bebês com até doze meses de idade. É recomendada para a vacinação em massa, por ter reduzido drasticamente a doença em vários países.

Um programa global de imunização contra a hepatite B precisa ser bem caracterizado e executado, sob supervisão científica de especialistas, durante todo o longo processo, para garantir a sua eficácia. O Brasil deve iniciar um programa baseado no conhecimento científico e na educação da população, e particularmente dos médicos, dos estudantes de medicina e de enfermagem. O conselho “Hepatitis Advisory Board”, composto por especialistas em saúde de vários países, após uma pesquisa feita em 8 países europeus em 1997, descobriu que a hepatite B é uma doença menos conhecida que a AIDS, sendo que 60% dos entrevistados desconheciam que a hepatite B é uma doença hepática. Esta Comissão declarou “o vírus da hepatite B é 100 vezes mais infeccioso que o HIV, e no mundo a hepatite B mata em um dia mais pessoas do que a AIDS em um ano.”

Esta revisão simplificada tem como objetivo orientar sobre os problemas que possam surgir no futuro em relação a vacinação contra a hepatite B no Brasil, e de contribuir para que a mesma seja feita de uma forma segura e eficaz.

A hepatite B é a doença mais freqüente entre as hepatites infecciosas. É a nona causa de mortalidade no mundo (1,5 milhões de óbitos por ano), mas pode ser

controlada por medidas profiláticas. O vírus da hepatite B (VHB) é transmitido por via parenteral através do sangue e seus derivados, pelo contacto sexual, por mães infectadas e seus bebês durante o parto, e pela exposição de mucosas a fluidos infectados. Há relatos de transmissão através de contatos íntimos por secreções como a saliva, urina, esperma, secreção vaginal e



**Figura 1.** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas presentes no extrato celular de uma cultura de levedura *Hansenula polymorpha* recombinante, coradas por prata: a) no final do processo, b) no meio do processo, c) no extrato bruto

ainda através de agulhas entre drogados, por acupuntura, “piercing” e tatuagens. A transmissão é também observada entre membros de uma mesma família ou entre pessoas que convivem aglomeradas, em ambientes densamente povoados.

A doença pode-se manifestar de forma fulminante, aguda, crônica ou inaparente (sem sintomatologia clínica). A fulminante e aguda (75 % em adultos e 10 % em bebês), são severas e causam mortalidade alta, mas a manifestação crônica (90 % em bebês) em 25 % dos casos leva o indivíduo à morte por cirrose e câncer de fígado. Mais de um milhão de portadores crônicos morrem a cada ano no mundo e só no Brasil há mais de três milhões deles, principais responsáveis pela disseminação do vírus na população.

De uma forma didática o VHB é distribuído geograficamente em três áreas prin-

cipais. A primeira, onde a prevalência do vírus é a mais baixa e engloba a América do Norte e o oeste europeu, com menos de 2 % de portadores crônicos e 4-6 % de indivíduos infectados, ou com marcadores virais presentes no sangue (antígenos ou anticorpos). A segunda, de prevalência média, engloba a América do Sul, Rússia, sul e leste da Europa onde 2-7 % são portadores crônicos e 20-55 % apresentam marcadores da presença do vírus. A terceira, de alta endemicidade é representada pelo sul e leste da Ásia, África Central e Bacia do Pacífico, onde 7-20 % são portadores crônicos e 70-90 % da população estão ou foram alguma vez infectados durante sua vida pregressa. No Brasil, há regiões de prevalência baixa, intermediária e alta. Nos estados do sul é da ordem de 0,3 % a 1,7 %, em São Paulo e Rio de Janeiro 1,0 a 2,1 % e no nordeste e na região amazônica 2,8 a 10,3 %. Existem, no entanto, grupos de risco ou regiões específicas, onde a prevalência é bastante elevada. Como exemplo, temos os profissionais paramédicos e médicos, dentistas, homossexuais, prostitutas, os usuários de drogas e habitantes de regiões endêmicas na Bacia Amazônica.

Nos últimos 15 anos a terapêutica da doença concentrou-se principalmente no tratamento com interferon, que tem refrado a resposta virológica em 30-40 % dos casos. O avanço mais promissor no tratamento da hepatite crônica é a terapia com análogos de nucleosídeos, que inibem a DNA polimerase viral pela incorporação no DNA viral resultando na terminação da elongação (ganciclovir, famciclovir) ou pelo bloqueamento da transcriptase reversa na replicação (lamivudine). No entanto, todos têm ação limitada ao período de tratamento e não eliminam o vírus do organismo. A desvantagem da lamivudine (3'-tiacitidine) é ainda devido à existência de mutantes do VHB observados durante o tratamento clínico. A terapia da hepatite B no futuro parece envolver a combinação

**Tabela . Rendimento comparativo de HBsAg entre leveduras e modo de cultivo.**

Cepa	Cultivo	Alimentação suplementar	Biomassa (g*/L)	HBsAg (mg/g* cels)
<i>S. cerevisiae</i> <sup>1</sup>	batch	—	040	0,03
<i>S. cerevisiae</i> <sup>2</sup>	fed batch	dextrose	120	0,03
<i>H. polymorpha</i>	batch	—	040	0,15
<i>H. polymorpha</i>	batch	—	037	0,40
<i>H. polymorpha</i>	fed batch	metanol	100	0,40
<i>H. polymorpha</i>	fed batch**	metanol	120	1,30

Batch- cultivo descontínuo alimentado.

Fed batch- cultivo contínuo alimentado.

\* peso úmido

\*\* condições especiais.

<sup>1</sup> dados obtidos com a cepa utilizada como controle nos experimentos.

<sup>2</sup> dados de literatura.

(Tabela) é gerada. Para estar seguro da atividade do HBsAg, foi utilizada na recombinação, a mesma sequência codificadora presente em *Saccharomyces*, já avaliada clinicamente (Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo **39**(1):39-42).

A Tabela mostra a vantagem do cultivo contínuo alimentado especial com metanol, para a cepa de *Hansenula polymorpha* recombinante, em termos de rendimento de HBsAg em comparação com *Saccharomyces cerevisiae* utilizada como controle (1) e com dados descritos na literatura (2).

A levedura recombinante tem mostrado ser geneticamente estável nas 50 gerações de crescimento, em meios não seletivos e metanol, como fonte única de carbono. Em seguimento, o clone selecionado foi analisado em 5 experimentos independentes por 200 horas de fermentação constante em fermentadores de 10 L (100 horas) e 50 L (100 horas) em meio não seletivo. A seguir, o caldo fermentado foi recolhido, as células lavadas, desintegradas e o antígeno purificado através de métodos físico-químicos. A produtividade foi ao redor de 1 g de HBsAg por kg de biomassa celular úmida, e o grau de pureza protéica, ao redor de 98 %.

A figura 1 mostra a pureza eletroforética da proteína S no final do processo e a figura 2 as partículas de HBsAg (~20 nm) visualizadas através de microscopia eletrônica, aumento 170.000 X, e coloração negativa. A tecnologia correspondente a essa cepa está sendo utilizada na produção da vacina no Instituto Butantan, e pode ser adaptada para uma escala de produção suficiente para cobrir a demanda nacional e dos países do Mercosul.

Os resultados dos testes pré-clínicos e clínicos com a vacina produzida pelo Instituto Butantan mostraram a eficácia do HBsAg produzido em *Hansenula*

A vacina foi testada em voluntários em 1997-1998. Três doses de vacina foram administradas em dois grupos de voluntários adultos (I e II), seguindo dois esquemas diferentes de imunização: 0, 1, 3 e 0, 1, 6 meses. Na seleção dos indivíduos, o critério utilizado foi a ausência de quaisquer marcadores do vírus da hepatite B. Os efeitos adversos observados nos vacinados foram menores do que os relatados por outros autores após a aplicação de

de imunomoduladores e agentes antivirais para casos de difícil tratamento, e a combinação de lamivudine com outros antivirais para a prevenção contra mutantes resistentes.

A única alternativa eficaz no controle da doença ainda continua sendo através da profilaxia com vacinas.

### Vacinas recombinantes

A história da imunologia da hepatite B começou nos anos 60 com a descoberta da atividade do antígeno de superfície do vírus (HBsAg), presente no soro de portadores crônicos da doença. Dessa forma, a primeira vacina contra a hepatite B foi desenvolvida com as partículas de HBsAg isoladas do plasma de portadores crônicos do VHB e é comercializada desde 1981. Apesar da boa proteção conferida, essa vacina plasmática apresenta algumas desvantagens: número limitado de doadores de sangue, alto custo do produto, potencial presença de contaminantes como o vírus da AIDS, outros vírus adventícios e agentes patogênicos insuspeitos.

Variados sistemas foram estudados com o objetivo de produzir uma vacina mais segura e economicamente mais viável, como a recombinante em bactéria em vaccínica, proteínas sintéticas, etc. (revisão em Purcell e Gerin Hepatology **5**:159-163, 1985; Ellis e Gerety, J. Med. Virol **31**:54-58, 1990), mas sem resultados comerciais.

Um sistema que utiliza células de mamíferos, particularmente as CHO (células de ovário de hamster), transformadas por plasmídios geneticamente construídos para expressar o HBsAg, tornou-se muito promissor por secretar as partículas ativas no

meio de cultura. No entanto, essa tecnologia requer equipamentos e materiais de alto custo, o que tem limitado a sua comercialização.

Desde 1987, duas vacinas produzidas por tecnologia do DNA recombinante, pela Merck Sharp & Dohme e pela Smith Kline Beecham, têm sido utilizadas com sucesso no mundo todo. Ambas contêm o HBsAg recombinante, expressão do gene S do VHB, em levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esse tipo de vacina é considerado seguro e protetor e por isso recomendado para a imunização em massa.

No final dos anos 80, leveduras metilotróficas foram adotadas para expressão de HbsAg, devido a sua capacidade e tolerância na síntese de proteínas heterólogas. Em *Pichia pastoris* é observada a síntese de 2-3 % de PCS (proteínas celulares solúveis), 5-8 % de PCS em *Hansenula polymorpha* em comparação a 0,5 % de PCS em *Saccharomyces cerevisiae* (tabela). A possível causa do alto rendimento de HBsAg nas leveduras metilotróficas, parece estar relacionada com o grande número de peroxissomos, que formam um nicho apropriado para o rearranjo e acumulação das partículas.

A N.G. Biotecnologia Ltda (São Paulo), em cooperação com cientistas russos desenvolveu um plasmídeo recombinante que expressa o HBsAg em *Hansenula polymorpha*, cepa DL-dU. As células transformadas com esse plasmídeo, quando cultivadas em condições apropriadas, podem chegar a sintetizar mais do que 50 % de suas PCS e acumular intracelularmente o HBsAg em partículas imunologicamente ativas. Em consequência, uma produção a custo bem menor que em *Saccharomyces*

vacinas recombinantes contra a hepatite B. A imunogenicidade, determinada pela pesquisa de anticorpos contra a hepatite B no soro dos vacinados, por imunoenensaio enzimático, mostrou resultados aproximados aos obtidos com a vacina comercial Engerix B, produzida pela Smith Kline Beecham, e utilizada como controle de referência.

### A importância dos subtipos virais.

A heterogeneidade sorológica do HBsAg está bem estabelecida. Todos os sorotipos conhecidos contêm um determinante comum **a** e outro de cada determinante mutuamente exclusivo **d/y** e **w/r** e/ou **q**. Assim, nove diferentes subtipos de HBsAg são conhecidos: **ayw1**, **ayw2**, **ayw3**, **ayw4**, **ayr**, **adw2**, **adw4**, **adrq** e **adrq**. Apesar da heterogeneidade genética e sorológica do HBV, não há distinção nas manifestações clínicas da infecção pelos diferentes subtipos virais. Uma informação de interesse é o da distribuição geográfica dos subtipos. Por exemplo, o subtipo **adw4** é encontrado quase que exclusivamente no novo mundo, e particularmente na América do Sul. Os subtipos **adw2** e **adw4** são os predominantes no Brasil (Gaspar & Yoshida, 1987). É importante observar-se que o subtipo **adw4** apresenta alto grau de divergência genômica dos outros HBVs.

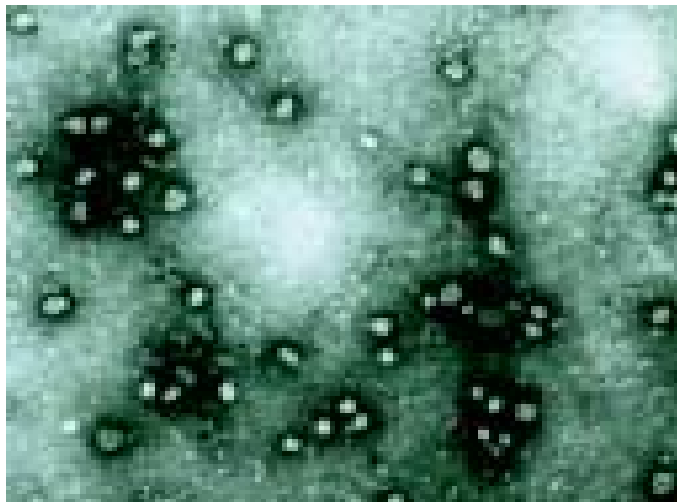
Considerando-se que as vacinas recombinantes hoje comercializadas contêm o HBsAg dos subtipos **ayw** ou **adr**, há a possibilidade de ocorrer falha na proteção contra os subtipos **adw2** e **adw4** nos indivíduos imunizados com estas vacinas, por exemplo no Brasil. Desta forma, a variabilidade do HBsAg pode ter implicações no estabelecimento de um programa de imunização em massa e no desenvolvimento de testes de diagnóstico da hepatite B. As diferenças antigênicas regionais dos subtipos virais devem ser consideradas na produção de vacinas mais protetoras.

### Eficácia da vacina.

Apesar dos excelentes resultados protetores obtidos com a vacina plasmática, foi observado que 3-10 % dos vacinados com o esquema completo de três doses não respondiam imunologicamente à vacina (não respondedores), e que outros 10-15 % respondiam mal, com títulos de

anticorpos  $\leq 10$  IU/L, considerados níveis não protetores (mal respondedores). O mecanismo da falha na resposta imunológica nesses indivíduos permanece sem explicação, entretanto, entre os fatores observados estão a idade avançada, a desnutrição, o componente genético (HLA), a obesidade, o tabagismo, e o alcoolismo. O tabagismo foi considerado em um artigo publicado na revista "Clinical Infectious Disease", em 1998, como fator indicativo de bom respondedor ou mal respondedor à vacina HB. Os autores mostram dados estatísticos de soroconversão em não fumantes da ordem de 94-98%, enquanto que em fumantes cai para 66-68 %.

Com a finalidade de superar os problemas de falha na resposta imune, a inclusão de epítomos adicionais do HBV na vacina pode ser considerada uma boa perspecti-



**Figura 2.** Partículas de HBsAg purificadas e visualizadas por coloração negativa e por microscopia em aumento de 170.000 X

va. Sabe-se que a infecção aguda pelo HBV gera anticorpos protetores e de longa duração. O espectro de anticorpos nestes indivíduos mostra a presença, não só, de anti-HBs mas também de anti-preS1, anti-preS2 (proteínas de superfície do vírus, ausentes nas vacinas recombinantes), e anti-HBc (proteína do nucleocapsídeo viral). A atividade sinérgica desses anticorpos provavelmente potencia a imunidade que, em geral, é para toda a vida do indivíduo.

Nos últimos dez anos, várias tentativas foram feitas para inserir os determinantes preS, inclusive por Granovski e colaboradores no Instituto Butantan. Todos os resultados mostram a ampliação da resposta imunológica, mas os resultados são controversos com relação à presença de

não respondedores e mal respondedores. Em 1997, o hepatologista inglês J.N. Zuckerman e colaboradores publicaram dados muito interessantes, mostrando que após a aplicação de uma única dose da nova vacina, contendo os antígenos preS1, preS2 e S dos subtipos virais **adw** e **ayw**, soroconverteram 69 % dos indivíduos, antes não respondedores à vacina comum.

Os resultados obtidos por Granovski e colaboradores, mostraram uma potenciação da resposta em mal respondedores. Este projeto foi feito somente em escala experimental devido ao baixo rendimento de HBsAg modificado. O objetivo futuro é de utilizar células hospedeiras mais produtivas como a *Hansenula polymorpha*.

### Esquema de vacinação, dosagem e vias de imunização.

Basicamente, dois esquemas de vacinação são recomendados para as vacinas recombinantes. O primeiro para recém-nascidos e grupos de risco: 0, 1, 2 e um reforço após 12 meses, e o segundo para crianças e adultos normais: 0, 1 e 6 meses. O esquema não é considerado ideal, devido ao longo período que distancia a segunda e a terceira injeção. Para melhorar o esquema atual de vacinação, existem estudos que mostram uma eficácia similar utilizando um período bem mais curto de 0, 7 e 21 dias. Outra alternativa pode ser a de melhorar a resposta através do uso de novos adjuvantes.

Em relação à dosagem, há uma dependência individual, considerando-se a idade, as condições de saúde, a imunodeficiência e o fabricante. A companhia Smith Kline Beecham formula em 20 µg, a Merck Sharp & Dohme em 10 µg e a Cheil Jedang em 3 µg. Em geral, a dose recomendada para crianças é a metade da adulta. A quantidade de antígeno por vacina depende também da via de administração.

A via de administração considerada ideal é no músculo deltóide em adultos e crianças maiores, ou no músculo do quadríceps da coxa em crianças menores. A via subcutânea é utilizada por vacina licenciada na Europa. O principal interesse na utilização da via intradérmica reside na redução da concentração protéica e conseqüentemente, na redução do custo

das vacinas. Entretanto, estudos estatísticos muito bem elaborados ainda são necessários para confirmar a eficácia e duração da resposta imune induzida por esta via alternativa de inoculação.

### **Vacina recombinante com HBsAg mutante.**

Devido à ampliação da vacinação contra a hepatite B no mundo todo, nos últimos anos, um novo problema emergiu com a ocorrência de casos isolados de mutantes do VHB, capazes de escapar da imunidade induzida pela vacinação. O primeiro caso descrito ocorreu na Itália, com uma criança nascida de mãe portadora crônica do VHB, e que foi imunizada com a vacina plasmática. A paciente apresentava alto nível de anticorpos e, no entanto, tornou-se positiva para marcadores virais e desenvolveu hepatite crônica. A mãe era portadora do vírus contendo a seqüência normal do HbsAg, enquanto que a criança era portadora de um vírus com uma seqüência alterada, com uma substituição do amino ácido arginina por glicina na posição 145 do HBsAg. Esta alteração protegia o VHB mutante de ser neutralizado pelos anticorpos induzidos através da vacinação. Em 1990, vários casos semelhantes foram relatados em Cingapura, Japão, EUA, Alemanha, Reino Unido e outros, todos originados após a vacinação.

Foi demonstrado por experimentos de transmissão, que o VHB mutante é capaz de se replicar como um vírus competente. Acredita-se, portanto, que as semelhanças antigênicas não são tão singulares como se imaginava. O acúmulo de vírus mutante pode acarretar problemas e invalidar a estratégia vacinal existente.

Nossos estudos hoje dirigem-se à construção de mutantes artificiais de HBsAg e à análise de suas capacidades antigênicas, imunogênicas e protetoras. Genes sintéticos, que codificam para HBsAg mutantes, serão clonados e expressados em leveduras. O antígeno purificado será testado em chimpanzés (o único animal susceptível ao VHB), em experimentos de desafio, para verificar a proteção contra o vírus selvagem e mutante. Este projeto está sendo desenvolvido em colaboração com o Centro de Controle de Doenças (CDC) de Atlanta-GA, EUA.

### **O papel dos adjuvantes na potenciação das vacinas.**

Proteínas purificadas, como a vacina contra a hepatite B, precisam ser formuladas com adjuvantes para potencializar a resposta imunológica. O adjuvante mais comumente utilizado com o HBsAg é o hidróxido de alumínio e, com menos freqüência, o fosfato de alumínio. Alguns estudos têm

mostrado a eficácia de outros novos adjuvantes. Entre eles estão as proteínas ativadas por choque em temperatura alta, "heat shock proteins" (HSPs), que quando complexadas com uma variedade de antígenos estimulam várias vezes a resposta imune. Além disso, como as HSPs são produtos naturais, nenhuma toxicidade foi associada após sua administração. A Smith Kline Beecham, fabricante da vacina Engerix B, já utiliza comercialmente o lipídio A monofosforil (MPL), que induz proteção em três meses com apenas duas doses, enquanto que com a Engerix/hidróxido de alumínio a mesma proteção só é obtida com três doses da vacina e após sete meses. Recentemente foi publicado que o adjuvante MF59, uma emulsão contendo um lipídio biometabolizável ("microfluidized squalene") e surfactantes, soroconverte em 100%, após duas aplicações combinadas com o HBsAg, gerando títulos de anticorpos 100 vezes maiores do que os obtidos com o adjuvante hidróxido de alumínio.

### **Vacinas de DNA**

A mais recente e promissora tecnologia para aplicação em vacinologia, a vacina de DNA, introduziu um novo princípio que pode revolucionar a prática de vacinação. DNA plasmidial, que codifica para as seqüências da proteína antigênica, sob o comando de um promotor viral, são inoculadas no organismo para que suas células sintetizem naturalmente o antígeno. A vantagem consiste em não inocular um agente infeccioso ou patogênico e/ou em se tratando de uma proteína, a de não correr o risco de alterar a sua estrutura ou a organização molecular. Elas representam, pelo menos teoricamente, a forma mais aproximada de uma infecção natural sem expressão de genes que controlam a reprodução do patógeno, e possuem uma grande chance de induzir proteção. Informações adicionais podem ser encontradas no volume 5 de 1998 da Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, volume 5 de 1998, sob o título: Vacinas de DNA, e em *Virus Rev & Res.* 2 (1,2), 1997.

A vacina é administrada experimentalmente em camundongos, por via intramuscular, em doses ao redor de 100 µg de DNA. Assim, no homem será necessário injetar miligramas de DNA, contendo seqüências virais e bacterianas. Atualmente, as vacinas recombinantes comercializadas são controladas e contêm menos que 100 pg de DNA celular residual por dose, por recomendação da Organização Mundial de Saúde.

Além disso, toda nova vacina desenvolvida apresenta algumas especificidades que devem ser consideradas. No caso da hepa-

tite B, que é combatida com sucesso através de vacinas recombinantes seguras, eficazes, e hoje produzidas a custo bem menor, será a vacina de DNA uma candidata séria para substituí-las? A segurança da vacina de DNA poderá somente ser comprovada vários anos após sua utilização, devido à presença de elementos reguladores da transcrição provenientes de vírus oncogênicos. A replicação sem controle do vetor, que é potencialmente capaz de se integrar no DNA celular, pode acarretar danos irreversíveis ao organismo e além disso, se houver síntese contínua de HBsAg intracelularmente, a hiper indução pode causar uma antigenemia.

No entanto, alguns aspectos podem ser considerados prospectivos em se tratando de hepatite B: 1) utilizar a vacina de DNA em não respondedores à vacina normal, 2) como vacina terapêutica com múltiplos epitópos (S, preS, núcleocapsídio, etc) expressos por um único vetor.

### **Vacinas combinadas.**

Resultados promissores têm sido obtidos pela Smith Kline Beecham através do ensaio para avaliar a vacina combinada de hepatite A e B. As vacinas combinadas são bem toleradas e induzem títulos altos de anticorpos neutralizantes contra o vírus A e B. Essa forma de vacina pode ser muito útil na vacinação de viajantes, militares das forças armadas, trabalhadores da área de saúde e outros grupos de risco.

A Organização Mundial de Saúde recomenda a integração da vacinação contra a hepatite B no programa geral de vacinação, na maioria dos países, inclusive no Brasil. A combinação da vacina contra a hepatite B com a tríplice bacteriana difteria-tétano-pertussis (DTP), pode simplificar o processo de integração, visto que ambas são formuladas no mesmo adjuvante, o hidróxido de alumínio e são aplicadas por via intramuscular nos primeiros anos de vida. Várias estratégias estão sendo investigadas com a finalidade de produzir uma combinação de vacina DTP-HB eficaz para todos os componentes, e bem tolerada como as duas vacinas aplicadas separadamente.

Recentemente, a Merck Sharp & Co. desenvolveram uma vacina com a combinação entre a proteína meningocócica e o HBsAg. A desvantagem desta vacina é que ela é recomendada para vacinação de bebês após os dois meses de idade, enquanto que a vacina HB é recomendada para imunização precoce de recém-nascidos, com a finalidade de evitar a hepatite crônica.

Outra combinação promissora é da vacina BCG com a HB, podendo inclusive ocorrer um efeito potenciador da resposta imune.