



ESTUDO DE MÉTODOS IMUNIZANTES CONTRA HCMV

MATHEUS SOARES OLIVEIRA

RESUMO

O citomegalovírus (CMV), é um herpesvírus humano (HHV) e pertencente à família Herpesviridae, sua transmissão ocorre por contato direto ou indireto entre as pessoas. As fontes de infecção conhecidas são amplas secreções corpóreas. Este trabalho de estudo bibliográfico, teve a proposta de identificar as dificuldades no desenvolvimento de imunizantes contra o Citomegalovírus Humano (HCMV). Foram utilizadas as bases de dados PUBMED, SCIELO, ACADEMIC GOOGLE E ELSEVIER, sendo relacionados no total 43 artigos publicados a partir do ano 2000 e um livro de Microbiologia médica. As concepções encontradas remetem ao CMV, um vírus da família do Herpes vírus que acomete em torno de 70% da população mundial sem provocar infecção ativa (latente), e por isso a disseminação torna-se recorrente. As pessoas mais susceptíveis a desenvolverem os sintomas e a fase grave da doença são as transplantadas, soropositivos para HIV, imunodeprimidos e fetos. Há atualmente várias vacinas em diversas fases de teste e outras ainda sendo desenvolvidas, explorando as diferentes formas de estimular a resposta do sistema imunológico humano para reconhecer o HCMV. As vacinas em desenvolvimento têm o objetivo de promover uma imunização eficaz a longo prazo, sendo elas: vacinas vivas atenuadas, vacinas de subunidades, vacinas de peptídeos, vacinas de peptídeos quiméricos, vacina com base em partículas semelhantes a vírus com envelope, vacinas de DNA à base de plasmídeo e vacinas baseadas em RNA. Embora haja uma diversidade de diferentes meios imunizantes sendo pesquisados, ainda é um desafio induzir uma memória imunológica permanente.

Palavras-chave: Vacinas; Herpesvírus Humano Tipo 5; Imunização.

1. INTRODUÇÃO

O citomegalovírus (CMV), também conhecido como HHV-5, é um herpesvírus humano (HHV) e pertencente à família *Herpesviridae*, assim como o vírus varicela-zoster, o vírus Epstein-Barr, o HHV-8 (vírus associado ao Sarcoma de Kaposi), e subfamília β -*Herpesviridae*. Seu genoma é constituído de DNA que se encontra no interior de um capsídeo protéico icosaédrico, o qual é rodeado por uma camada amorfa de proteínas, chamada tegumento e envolvido por uma bicamada lipídica, onde se encontram as glicoproteínas virais. (Junqueira, Sancho e Santos et al., 2008).

O citomegalovírus é um importante patógeno para fetos, receptores de transplante (enxerto) e pacientes com imunodeficiência adquirida, sendo responsável pela alta taxa de mortalidade. (Locatelli et al., 2000).

A transmissão ocorre por contato direto ou indireto entre as pessoas. As fontes de infecção conhecidas incluem urina, fezes, lágrimas, sangue, secreções de orofaringe, cervice, vagina, espermatozoides e leite materno. A excreção do vírus persiste por anos após a infecção. (Locatelli et al., 2000).

O espectro da doença constitui uma síndrome de febre, leucopenia, artralgia e mialgia. Complicações que ameaçam a vida são principalmente pneumonia, hepatites, enterites e

encefalites. As infecções clinicamente significantes são mais frequentes em receptores na infecção primária por HCMV, habitualmente mais severa do que a secundária. (Locatelli et al., 2000)

Este trabalho de estudo bibliográfico, teve a proposta de identificar as dificuldades no desenvolvimento de imunizantes contra o Citomegalovírus Humano (HCMV).

2. MÉTODO

Trata-se de uma pesquisa bibliográfica em que foram utilizadas as bases de dados online PUBMED, SCIELO, ACADEMIC GOOGLE e ELSEVIER. Inicialmente foi realizada uma busca utilizando os seguintes descritores: imunização contra HCMV, infecção congênita de HCMV, imunização de gestantes soropositivas contra HCMV. Foram utilizados como critérios de inclusão os textos que abordavam o desenvolvimento e meios de imunização contra HCMV, e textos publicados entre 2000 e 2021 e um livro de Microbiologia Médica. Assim, foram encontrados 43 artigos referentes à imunização e resposta imunológica contra HCMV, sendo excluídos aqueles que não atendiam aos critérios estabelecidos. Ao final, foram selecionados 14 artigos, sendo organizados em fichas nas quais constavam dados de identificação dos artigos e uma síntese a respeito das formas e dificuldades na imunização contra HCMV.

3. RESULTADOS

3.1 Replicação e resposta imune contra HCMV

O HCMV é um membro da subfamília *Betaherpesvirinae*, sendo considerado linfotrópico. Apresenta o maior genoma entre os herpesvírus humanos. Em contraste com a definição tradicional de vírus, que afirma que um virion deve conter DNA ou RNA, pesquisas agora indicam que o virion do CMV transporta mRNAs específicos para dentro da célula para facilitar a infecção. O CMV humano só se replica em células humanas. Fibroblastos, células epiteliais, macrófagos e outras células são permissivas para a replicação do CMV. O vírus estabelece uma infecção latente em linfócitos mononucleares, células do estroma da medula óssea e outras células. (Murray, Rosenthal e Pfaller.,2006).

A replicação dos herpesvírus inicia-se pela interação de glicoproteínas virais com os receptores da superfície celular. O tropismo é restrito pela expressão tecido específico de seus receptores. O nucleocapsídeo é então liberado no citoplasma através da fusão do envelope com a membrana plasmática. Enzimas e fatores de transcrição são transportados para dentro da célula no tegumento do virion. O nucleocapsídeo liga-se à membrana nuclear e o genoma é introduzido no núcleo, onde será transcrito e replicado. (Murray, Rosenthal e Pfaller.,2006).

O genoma viral é transcrito pela polimerase de ácido ribonucléico (RNA) DNA-dependente e é regulado por fatores nucleares celulares e codificados pelo vírus. A interação destes fatores determina se serão produzidas as proteínas necessárias para uma infecção lítica, persistente ou latente. As células que promovem uma infecção latente transcrevem um conjunto especial de genes sem replicação genômica. (Murray, Rosenthal e Pfaller.,2006).

3.2 Patogênese e resposta imunológica

O CMV é um excelente parasita e estabelece rapidamente infecções persistentes e latentes, em vez de uma extensa infecção lítica. O CMV está altamente associado a células, sendo disseminado pelo corpo dentro de células infectadas, especialmente linfócitos e leucócitos. O vírus é reativado por imunossupressão (p. ex., corticosteróides, infecção por HIV) e possivelmente por estimulação alogênica (i.e., a resposta do hospedeiro contra células transfundidas ou transplantadas). (Murray, Rosenthal e Pfaller.,2006).

A imunidade celular é essencial para o controle do crescimento e a regressão da

infecção por CMV. Entretanto, este vírus apresenta diversas maneiras de escapar da resposta imune. A infecção por CMV altera a função de linfócitos e leucócitos. O vírus impede a apresentação de antígenos para as células T CD8 citotóxicas e T CD4 por impedir a expressão de moléculas do MHC I na superfície celular e por interferir na expressão, induzida por citocinas, de moléculas do MHC II em células apresentadoras de antígenos (incluindo as células infectadas). Uma proteína viral também bloqueia o ataque, pelas células NK, de células infectadas por CMV. O CMV codifica um análogo da interleucina-10 que inibe respostas imunes protetoras do tipo TH1. (Murray, Rosenthal e Pfaller.,2006).

3.3 Vacinas vivas atenuadas

Wang e seus colaboradores (2016) relatam um passo fundamental para uma vacina eficaz contra esse herpes vírus perigoso. Eles desenvolveram uma vacina candidata de vírus inteiro a partir da cepa viva atenuada AD169, com modificações genéticas para melhorar sua imunogenicidade e atenuação.

Primeiramente, restauraram a expressão do complexo pentamérico de proteína gH/gL/pUL128-131, um alvo principal para anticorpos neutralizantes na imunidade natural. Em seguida, incorporaram um interruptor de estabilização de proteínas, quimicamente controlado, no vírus, permitindo-os regular a replicação viral com um composto sintético chamado Shield-1. O vírus se replicou tão eficientemente quanto seu vírus parental na presença de Shield-1, mas falhou em produzir progênie após a remoção do composto. A vacina foi imunogênica em várias espécies animais e induziu anticorpos neutralizantes duráveis, bem como CD4⁺ e células T CD8⁺ a múltiplos antígenos virais em primatas não humanos. (Wang et al., 2016).

O Triplex é um poxvírus atenuado recombinante (vaccinia Ankara modificada) que expressa antígenos de CMV imunodominantes. A vacina triplex foi desenvolvida para aumentar as células T específicas do citomegalovírus (CMV) e prevenir a reativação do CMV logo após o transplante de células-tronco hematopoéticas (HCT). A vacina triplex foi desenvolvida para aumentar as células T específicas do citomegalovírus (CMV) e prevenir a reativação do CMV logo após o transplante de células-tronco hematopoéticas (HCT). A incidência de GVHD aguda grave após a injeção foi semelhante entre os grupos (razão de risco, 1,1 [CI, 0,53 a 2,4]; $P = 0,23$). Os níveis de células T específicas para pp65 de longa duração com fenótipo de memória efetora foram significativamente maiores no Triplex do que nos receptores de placebo. (Adaptado, Ibrahim et al., 2020).

3.4 Vacinas de subunidade

Em estudos publicados em 2011 e 2021, foi observado que tanto o desenvolvimento de anticorpos específicos para CMV quanto as respostas de células T CD4⁺ podem ser reforçadas após a vacinação com uma vacina gB / MF59 de CMV em mulheres que tiveram infecção crônica por CMV. (Sabbaj et al., 2011; Scarpini et al., 2021).

Um estudo randomizado controlado por placebo de fase 2 (NCT00299260), a vacina gB/MF59 foi testada em adultos aguardando SOT para avaliar se poderia prevenir a doença de órgãos-alvo do HCMV. Eles administraram a vacina gB/MF59 ou placebo a 70 pacientes soronegativos e 70 soropositivos em 0, 1 e 6 meses. Os títulos de anticorpos GB foram significativamente aumentados em ambos os receptores soronegativos e soropositivos da vacina do que no grupo placebo. Naqueles que desenvolveram viremia após o transplante, os títulos de anticorpos gB se correlacionaram inversamente com sua duração. Em pacientes soronegativos com doadores soropositivos, a duração da viremia e o número de dias de tratamento com ganciclovir foram reduzidos nos receptores da vacina. (Scarpini et al., 2021).

3.5 Vacinas de vetor viral

A Vaccinia Ankara (MVA) modificada por poxvírus atenuado é uma vacina de base viral com perfil de segurança ideal e capaz de induzir uma forte resposta imune contra antígenos recombinantes. A City of Hope desenvolveu um novo candidato a vacina HCMV chamado Triplex, construindo um MVA que codifica três antígenos imunodominantes de HCMV, pp65, IE1-exon4 e IE2-exon5. Triplex foi avaliado pela primeira vez em um estudo de fase 1 em 24 adultos saudáveis, com ou sem imunidade ao HCMV. Três níveis de dose crescentes da vacina Triplex foram avaliados, cada um testado em uma coorte de 8 indivíduos que receberam a vacina e uma injeção de reforço idêntica 28 dias depois. O status sorológico do HCMV foi verificado nos dias 0 - 180 e 360. O estudo estabeleceu que as vacinações eram seguras sem toxicidade limitante de dose, sem eventos adversos graves e apenas reatogenicidade local e sistêmica leve. (Scarpini et al., 2021).

A Triplex também está atualmente em avaliação na população pediátrica: um estudo clínico de Fase 1/2 está em andamento para determinar a dose ideal e o efeito protetor desta vacina em crianças soropositivas para HCMV recebendo um TCTH alogênico (NCT03354728). A Triplex também pode eventualmente ser usada em pacientes que recebem SOT e os estudos nessa população estão sendo planejados. (Scarpini et al., 2021)

3.6 Vacinas Peptídicas Quiméricas

As vacinas quiméricas têm sido principalmente estudadas para a proteção de receptores de TCTH. A copiosa proteína do tegumento pp65 foi identificada como o principal antígeno eficaz para induzir a resposta imune natural das células T. De fato, pp65 é um dos principais alvos para linfócitos T citotóxicos (CTLs) CD8⁺ restritos a HLA classe I. Em particular, pp65495-503, um epítipo de CTL dentro da proteína pp65 que é restrito ao alelo HLA A*0201 de alta frequência, é considerado altamente protetor devido à sua baixa variabilidade de sequência entre isolados virais e pode expandir CTLs de memória específicos de pp65 humanos. As células infectadas pelo HCMV expressam pp65 tanto no início quanto no final da infecção, tornando-o um alvo de vacina apropriado. Além disso, notou-se que a ligação de CTL pp65 e um epítipo auxiliar T aumentou marcadamente a imunogenicidade destas vacinas. Assim, este epítipo CTL foi fundido a um epítipo auxiliar T universal, um epítipo pan HLA-DR sintético (PADRE) ou uma sequência natural de tétano (Tet), com ou sem CpG 7909, um receptor 9 tipo toll (TLR9) antagonista oligonucleotídico sintético, e a fusão mostrou perfis de imunogenicidade positivos. O CpG7909, que é um importante receptor expresso em células do sistema imunológico, aumenta ainda mais a atividade da vacina, permitindo a redução de sua dosagem. O uso de epítopos de CTLs restritos a HLA para uma vacina eliminaria os problemas relativos a vacinas virais vivas atenuadas ou recombinantes em receptores de TCTH. Além disso, foi demonstrado que as complicações do HCMV em pacientes com TCTH foram associadas a baixos níveis de CTLs pp65, enquanto a proteção contra reativação foi associada a altos níveis. Então, uma vacina capaz de induzir níveis protetores de CTLs pp65 pode ser benéfica para os receptores de TCTH. Esta vacina candidata foi desenvolvida pelo City of Hope National Medical Center e é chamada CMVPepVax. (Scarpini et al., 2021).

A vacinação mais precoce pode resultar em baixa eficácia devido à limitada reconstituição hematopoiética. Com base nesses resultados favoráveis, o CMVPepVax está atualmente sendo examinado em um estudo de Fase 2 multicêntrico e controlado por placebo em andamento (NCT02396134), que determinará ainda mais o papel e o impacto dessa estratégia no cenário do TCTH. (Scarpini et al., 2021).

3.7 Complexo Pentamérico

O HCMV PC (Complexo pentâmero do citomegalovírus humano) é um complexo de cinco componentes ancorado à glicoproteína H responsável pela entrada viral mediada por

receptor nas células epiteliais e endoteliais do hospedeiro. Vários estudos têm mostrado que o PC é um foco válido para novos modelos de vacinas. Também foi demonstrado que uma vacina com expressão de PC restaurada induz títulos de anticorpos neutralizantes em níveis dez vezes maiores do que uma vacina gB recombinante. Os títulos neutralizantes de pico resultantes desta vacinação foram próximos aos níveis encontrados em indivíduos soropositivos para HCMV, e foram mantidos em coelhos por mais de um ano. Além disso, estudos demonstraram que uma resposta de anticorpos ao PC pode ser gerada em indivíduos com infecções primárias por HCMV, bem como naqueles com infecções reativadas. Nesses indivíduos com infecções reativadas, os anticorpos neutralizantes direcionados ao dímero pUL130-UL131A ou ao trímero pUL128-UL131A foram significativamente mais fortes do que aqueles direcionados ao gH ou gB. Da mesma forma, todo o PC induziu respostas de anticorpos significativamente mais potentes contra HCMV do que aquelas induzidas por um complexo gH/gL. (Anderholm, Bierle e Scheleiss et al., 2016)

3.8 Vacinas de peptídeo

Ensaios-piloto sugerindo CTLs específicos para pp65 podem proteger os pacientes de TCTH de complicações pós-operatórias de HCMV que levaram ao desenvolvimento de vacinas com foco em epítomos pp65. O epítomo CTL HLA A * 0201 pp65 foi identificado como uma sequência peptídica promissora devido à sua variação de sequência limitada entre os isolados virais analisados. HLA A * 0201 pp65 foi fundido a um epítomo pan-DR sintético (PADRE) ou a uma sequência tetânica natural (Tet), ambos os quais são conhecidos como epítomos T helper universais. (Anderholm, Bierle e Scheleiss et al., 2016).

3.9 Vacina com base em partículas semelhantes a vírus com envelope

Uma vacina candidata VLP contra o HCMV foi desenvolvida pela Redvax GmbH, um spin-off da Redbiotec AG, uma empresa biofarmacêutica suíça privada. Esta tecnologia é baseada em proteínas expressas por baculovírus. Embora inicialmente a purificação dessas VLPs fosse difícil devido ao seu tamanho relativamente grande, foi desenvolvida uma tecnologia que permite uma clarificação e concentração mais fáceis dessas partículas. Esta tecnologia foi recentemente adquirida pela Pfizer vacinas, e esta empresa atualmente tem planos de continuar a desenvolvê-la como uma plataforma candidata de vacina HCMV. (Anderholm, Bierle e Scheleiss et al., 2016).

3.10 Vacinas de DNA à base de plasmídeo

O FDA define vacinas de DNA como "preparações de plasmídeo purificado contendo uma ou mais sequências de DNA capazes de induzir e / ou promover uma resposta imune contra um patógeno". (Anderholm, Bierle e Scheleiss et al., 2016).

Uma vacina de DNA baseada em plasmídeo contra HCMV avançou recentemente para os ensaios clínicos de fase III. ASP0113 (anteriormente conhecido como VCL-CB01 e TransVax TM) é uma vacina de DNA contra HCMV que foi desenvolvida pela Vical e está atualmente sob licença da Astellas para testes clínicos de fase III e comercialização. A vacina é uma formulação de dois plasmídeos que expressam gB e pp65 que são entregues em nanopartículas compreendendo um poloxâmero tribloco não iônico, CRL1005, e um surfactante catiônico, cloreto de benzalcônio. (Anderholm, Bierle e Scheleiss et al., 2016).

3.11 Vacinas baseadas em RNA

Uma vacina de RNA usa uma cópia sintética de um RNA mensageiro de patógeno natural (mRNA) e leva o sistema imunológico a produzir respostas contra seu antígeno correspondente. As vacinas de RNA podem ser formadas por mRNA não replicante, que codifica apenas antígenos de interesse, ou por mRNA auto amplificante, que também codifica

proteínas necessárias para a replicação do RNA. A entrega do mRNA é conseguida por uma co-formulação da molécula em nanopartículas lipídicas, que protegem as fitas do RNA e auxiliam na sua absorção nas células. (Scarpini et al., 2021).

MicroRNAs (miRNAs) desempenham papéis importantes em vírus. Este mecanismo também é utilizado pelo citomegalovírus humano (HCMV) no processo de infecção e patogênese. O miRNA codificado por HCMV, hcmv-miR-US25-1-5p, foi altamente expresso durante infecções líticas e latentes e foi encontrado para inibir a replicação viral. A superexpressão de hcmv-miR-US25-1-5p resultou em uma redução significativa na síntese de DNA de HCMV em comparação com células transfectadas com miR-NC. (Jiang et al., 2015).

4. CONCLUSÃO

O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o citomegalovírus é considerado prioridade, devido à resistência do vírus a antivirais. A vacinação poderá diminuir as sequelas e evitar casos graves da doença, em recém nascidos e imunocomprometidos e tornando mais seguro os transplantes e a gestação de mulheres que obtiverem contato com o patógeno. As vacinas que se mostraram mais promissoras foram as multivetoriais para ativar de diferentes formas o sistema imunológico, como as vacinas vetoriais e a de mRNA com o uso de adjuvantes para melhorar a resposta imunológica.

REFERÊNCIAS

ADLER, S. P. et al. Phase 1 clinical trial of a conditionally replication-defective human cytomegalovirus (CMV) vaccine in CMV-seronegative subjects. *The Journal of infectious diseases*, v. 220, n. 3, p. 411-419, 2019.

ALDOSS, I. et al. "Poxvirus Vectored Cytomegalovirus Vaccine to Prevent Cytomegalovirus Viremia in Transplant Recipients: A Phase 2, Randomized Clinical Trial." *Annals of internal medicine* vol. 172,5 (2020): 306-316. <<http://doi:10.7326/M19-2511>>. Acesso em: 17/09/2021

ANDERHOLM, K.M., BIERLE, C.J. & SCHLEISS, M.R. Cytomegalovirus Vaccines: Current Status and Future Prospects. *Drugs* 76, 1625–1645 (2016). <<https://doi.org/10.1007/s40265-016-0653-5>>. Acesso em: 13/10/2021

DIGGINS, N. L.; SKALSKY, R. L.; HANCOCK, M. H. Regulamento de latência e reativação por miRNAs de citomegalovírus humano. *Pathogens* 2021, 10, 200. <<https://doi.org/10.3390/pathogens10020200>>. Acesso em: 11/09/2021

FU, T. et al. Restoration of viral epithelial tropism improves immunogenicity in rabbits and rhesus macaques for a whole virion vaccine of human cytomegalovirus. *Vaccine*, v. 30, n. 52, p. 7469-7474, 2012. Acesso em: 12/09/2021

GERNA, G. e LILLERI, D. "Human cytomegalovirus (HCMV) infection/re-infection: development of a protective HCMV vaccine." *The new microbiologica* vol. 42,1; 1-20. 2019.

JIANG, S. et al. "Human cytomegalovirus microRNA miR-US25-1-5p inhibits viral replication by targeting multiple cellular genes during infection." *Gene* vol. 570,1; 108-14. 2015: .<<http://doi:10.1016/j.gene.2015.06.009>> Acesso em: 21/07/2021

JUNQUEIRA, J. J. M., SANCHO, T. M., SANTOS, V. A. Citomegalovírus: revisão dos

aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos e de tratamento. Newslab, v. 86, p. 88-104, 2008.

LOBATO-SILVA, D. F. Citomegalovírus: epidemiologia baseada em dados de soroprevalência. Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua, v. 7, n. esp, p. 213-219, dez. 2016 Disponível em <http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232016000500213&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 02 nov. 2021.

LOCATELLI, R. Citomegalovírus. A doença no homem e as dificuldades de diagnósticos laboratorial. Journal of Health Sciences, v. 2, n. 1, 2000.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia médica. 5th ed. Elsevier Health Sciences, 2006.

SABBAJ S., PASS R. F., PICHON S., GOEPFERT P. A., Glycoprotein B Vaccine Is Capable of Boosting Tanto as respostas de anticorpos quanto de células T CD4 ao citomegalovírus em mulheres cronicamente infectadas, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 203, Issue 11, 1 de junho de 2011, páginas 1534–1541, <<https://doi.org/10.1093/infdis/jir138>>. Acesso em: 11/10/2021

SCARPINI, S. et al. “Desenvolvimento de uma vacina contra o citomegalovírus humano: avanços, barreiras e implicações para a prática clínica.” *Vaccines* vol. 9,6 551. 25 de maio. 2021, <<https://doi: 10.3390/vacines9060551>>. Acesso em: 15/09/2021

SERRA, F. C. et al. Soroprevalência de citomegalovírus em gestantes brasileiras de classe socioeconômica favorecida. DST J Bras Doenças Sex Transm, v. 21, n. 1, p. 12-5, 2009.

WANG, D. et al. “A replication-defective human cytomegalovirus vaccine for prevention of congenital infection.” *Science translational medicine* vol. 8, pág. 362 (2016): 362ra145. <<https://doi:10.1126/scitranslmed.aaf9387>>. Acesso em: 12/10/2021