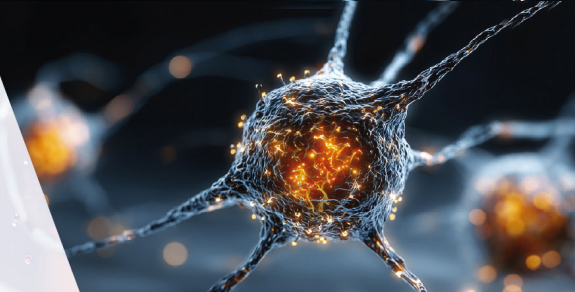


A eficácia das vacinas contra o vírus da língua azul (BTV) explicada através de princípios básicos de imunologia

Por Alfonso Martín-Fontecha, Technical Business Development Manager, Syva



No.2 A VACINAÇÃO PREVENTIVA CONTRA O BTV E A EHD (DOENÇA HEMORRÁGICA EPIZOÓTICA) NÃO É UM LUXO — É UMA NECESSIDADE ESTRATÉGICA



Resumo

A língua azul é uma doença de ruminantes transmitida por artrópodes, com distribuição mundial, transmitida durante a hematofagia por determinadas espécies de dípteros do género *Culicoides*. A infeção pelo vírus da língua azul (BTV) causa morbilidade e mortalidade significativas em ovinos e bovinos. O genoma do BTV é composto por dez segmentos de ARN de dupla cadeia que codificam sete proteínas estruturais (VP1–VP7) e quatro proteínas não estruturais (NS1–NS4). O vírus é classificado em 27 serótipos de acordo com as características genéticas e antigénicas da proteína neutralizante VP2. A VP7 é um determinante major da especificidade de serogrupo, e a maioria dos ensaios serológicos utilizados para detetar BTV baseia-se na deteção de anticorpos anti-VP7.

Embora esteja distribuída sobretudo em regiões tropicais, desde 1998 foram notificados surtos que se propagaram da região do Mediterrâneo para o norte da Europa. Particularmente desafiante foi o recente surto de vírus da língua azul serótipo 3 (BTV-3), ocorrido nos Países Baixos em setembro de 2023, com quase 6.000 casos confirmados em março de 2024. Pouco depois ficaram disponíveis vacinas inativadas, utilizadas em campanhas de vacinação iniciadas em maio de 2024, o que evidenciou a rápida resposta dos Laboratórios SYVA e de outras empresas farmacêuticas veterinárias para contrariar aquilo que, de outro modo, teria causado perdas severas nas populações de ruminantes.

Este breve artigo pretende rever princípios fundamentais de imunologia, com o objetivo de contextualizar a compreensão dos mecanismos subjacentes à eficácia das vacinas contra o BTV.

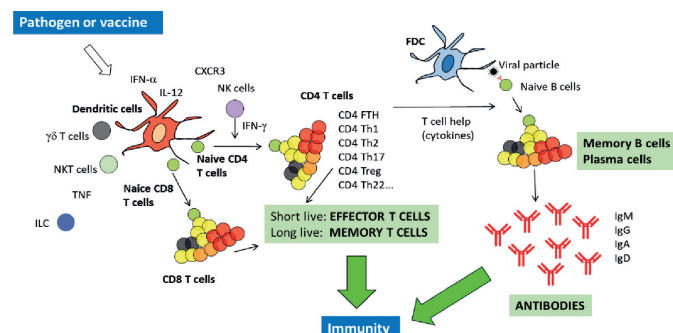


Figura 1: A vacinação ou a infeção ativa múltiplos componentes celulares e moleculares do sistema imunitário. NK, células natural killer; NKT, células T natural killer; ILC, células linfoides inatas; FDC, células dendríticas foliculares; IL, interleucina; IFN, interferão; TNF, fator de necrose tumoral; CXCR3, recetor de quimiocinas C-X-C; Th, células T auxiliares; Treg, células T reguladoras; Tfh, células T auxiliares foliculares.

O sistema imunitário (SI): a sua enorme complexidade traduzida em conceitos básicos

A capacidade de memória dos linfócitos é a base do funcionamento das vacinas e um dos pilares da medicina preventiva moderna. De forma simples, a vacinação é essencialmente a manipulação deliberada do sistema imunitário para que este mimetize uma infeção em condições controladas e avirulentas, permitindo a geração de células de memória de longa duração, mantidas em estado de prontidão para responder a uma infeção subsequente potencialmente ameaçadora.

Após a infeção ou a vacinação, numerosos componentes celulares e moleculares são ativados e mobilizados com o objetivo final de controlar os agentes patogénicos invasores ou gerar células de memória induzidas pela vacina. Embora as células B (linfócitos B) produzam uma resposta humoral de anticorpos, por simplificação referir-nos-emos aqui a “respostas celulares” apenas como as que envolvem células não-B (por exemplo, células T CD4+ e CD8+). Nas horas que se seguem à vacinação, as chamadas células da imunidade inata — incluindo monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (DCs), células natural killer (NK), células linfoides inatas (ILCs), células T γδ, entre outras — participam nos primeiros eventos após a ativação do sistema imunitário.

Cada uma destas populações celulares é recrutada para o local de vacinação ou para outros locais imunologicamente relevantes, orientada e coordenada por pequenas moléculas solúveis conhecidas como



citocinas e quimiocinas. Além disso, a imunidade adaptativa — isto é, o conjunto de eventos complexos que conduz à geração de células T e B efetoras de curta duração e de células B de memória de longa duração — demora mais tempo a desenvolver-se, classicamente pelo menos 7 a 10 dias.

Um ator celular fundamental na ligação entre imunidade inata e adaptativa é a célula dendrítica (DC), um tipo especializado de célula apresentadora de antígeno (APC). As DCs têm a capacidade de captar antígenos vacinais, migrar do local de vacinação nos tecidos periféricos para os gânglios linfáticos de drenagem (DLNs) mais próximos e apresentar, à sua superfície, antígenos processados intracelularmente para interação cognata com células T CD4+ e CD8+ específicas para antígeno (Abbas et al., 2025).

Um nível adicional de complexidade resulta da localização anatómica onde estes eventos ocorrem. Dependendo da via de vacinação, podem operar mecanismos distintos na ligação entre os eventos iniciais da imunidade inata e o braço adaptativo do sistema imunitário. Na relativa ausência de abundantes células imunitárias residentes no tecido muscular em repouso, a via intramuscular depende da rica vascularização para facilitar o recrutamento de APCs. Quando administrada por via subcutânea, um maior número de células dendríticas e macrófagos locais pode contribuir para uma sinalização inata local mais intensa. Quando administrada por via intradérmica, a abundância de células de Langerhans residentes e de células dendríticas dérmicas produz frequentemente uma ativação imunitária muito robusta com doses menores de antígeno vacinal.

Além disso, os gânglios linfáticos de drenagem (DLNs) — órgãos imunitários estrategicamente compartimentalizados, nos quais as células B formam folículos e entram em contacto direto com um subtipo especializado de células dendríticas designadas células dendríticas foliculares (FDCs) — constituem o principal local de desenvolvimento de células B produtoras de anticorpos e de células T e B de memória específicas para antígeno.

Resultados da imunização ativa e eficácia: respostas celulares versus humorais

De acordo com a Agência Europeia de Medicamentos (EMA), nos estudos pré-clínicos, a demonstração de eficácia deve ser realizada em condições laboratoriais bem controladas através de um ensaio de prova de infeção (*challenge*) após administração do medicamento veterinário imunológico à espécie-alvo. Tanto quanto possível, as condições de *challenge* devem reproduzir as condições naturais de infeção. Estes estudos são considerados bem-sucedidos

quando se observam diferenças estatisticamente significativas entre grupos de animais vacinados e não vacinados em parâmetros previamente definidos (virémia, temperatura, diarreia, etc.).

Intuitivamente, isto associa-se a parâmetros imunológicos mensuráveis induzidos ativamente pela vacina. Assim, a utilização das tecnologias disponíveis para avaliar variáveis imunitárias e correlacionar a administração da vacina com a proteção é um objetivo prosseguido tanto pela academia como pela indústria. No entanto, os referenciais farmacopeicos não reconhecem atualmente as respostas celulares como parâmetros relacionados com a eficácia. Vários ensaios *in vitro* foram desenvolvidos para este efeito e são descritos abaixo.

A técnica ELISPOT (*Enzyme-Linked ImmunoSpot*) é um ensaio imunológico utilizado para detetar e quantificar células individuais que secretam uma proteína específica, a qual pode servir como correlato de ativação imunitária. Como mede, ao nível de célula única, a frequência de células imunitárias específicas para antígeno que produzem uma determinada molécula (por exemplo, IFN- γ), é frequentemente utilizada em estudos académicos de vacinas, imunoterapia e investigação em doenças infecciosas. É altamente sensível, permitindo detetar mesmo células T e NK específicas raras geradas após ativação imunitária mediada por vacinas (Janetzki, 2015); uma contagem elevada de *spots* (cada *spot* correspondendo a uma célula produtora de IFN- γ) está associada a respostas vacinais ótimas.

Várias questões dificultam a aplicação de leituras celulares na avaliação da eficácia vacinal na indústria. Entre elas incluem-se o manuseamento laborioso e moroso de amostras animais (purificação de células mononucleares do sangue periférico e armazenamento a temperaturas inferiores a -20 °C), a colheita em momentos que frequentemente não coincidem com os calendários clássicos de avaliação de anticorpos, o elevado custo do equipamento e a sua adaptação a processos em conformidade com Boas Práticas de Fabrico (GMP), bem como desafios relacionados com exatidão, reprodutibilidade e robustez. As diferenças entre indivíduos saudáveis e não infetados complicam ainda mais o estabelecimento de controlos biológicos de referência ótimos. Importa salientar que nenhuma farmacopeia inclui atualmente estas tecnologias como parâmetros formais de eficácia.

O ensaio imunoenzimático ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) é uma técnica bioquímica amplamente utilizada para detetar e medir anticorpos específicos no soro de animais vacinados. O ensaio é fácil de executar, económico e rápido. A sua exatidão,

precisão, especificidade, linearidade e robustez são controláveis, o que frequentemente faz dele a referência (por vezes a única) de avaliação de eficácia aceite pelas autoridades reguladoras e, por isso, amplamente adotada pelas empresas farmacêuticas nos dossiers de vacinas. No contexto da vacinação contra o vírus da língua azul (BTV), esta técnica serológica para deteção de anticorpos anti-BTV no soro serve como forma de demonstrar imunidade induzida pela vacina. A resposta serológica ao BTV desenvolve-se entre 7 e 14 dias após a infeção; assim, o diagnóstico da infeção por BTV pode basear-se na deteção destes anticorpos anti-BTV, incluindo anticorpos anti-VP7 e anti-VP2.

Anticorpos neutralizantes (NAb) como biomarcador de eficácia vacinal: miragem e realidade

Os anticorpos neutralizantes (NAb) são anticorpos que se ligam diretamente aos vírus. Como tal, são potencialmente capazes de impedir (neutralizar) a entrada viral nas células hospedeiras de mamíferos, prevenindo assim a progressão da doença. Os NAb são produzidos por células B que entram em contacto direto com estruturas superficiais virais naturais, não modificadas (epítopos conformacionais). Isto ocorre através da drenagem direta de partículas vacinais desde o local de administração até ao DLN mais próximo, onde são apresentadas por FDCs a células B naïve próximas.

Em contraste, a grande maioria dos anticorpos produzidos durante a infeção ou vacinação, embora não neutralizantes, é gerada contra epítopos lineares após o processamento de antígenos virais pela maquinaria intracelular das APCs, podendo também contribuir para o controlo da doença.

O teste de seroneutralização *in vitro* (SNT, *serum neutralisation test*) é utilizado tanto para identificação como para titulação de anticorpos específicos de serótipo do BTV. Devido à grande variedade de serótipos co-circulantes a nível mundial, a sua distinção por métodos serológicos é essencial para a vigilância. Contudo, existem diferentes protocolos de SNT, o que dificulta a interpretação e a comparação de resultados entre laboratórios (Worwa et al., 2013).

O SNT baseia-se em diluições seriadas do soro em teste, incubadas com uma quantidade fixa de cada serótipo de BTV. Em seguida, adicionam-se células (geralmente células BHK ou Vero), que são incubadas durante 3–5 dias, após o que se avalia o efeito citopático (CPE; lise/destruição celular). O título de anticorpos é determinado como a diluição mais elevada capaz de neutralizar >75% do CPE.

A principal vantagem do SNT é a sua capacidade de evitar reatividade cruzada com outros serogrupos de *Orbivirus*, permitindo simultaneamente a discriminação entre serótipos de BTV. Importa sublinhar que os SNTs são realizados *in vitro* e, por conseguinte, qualquer tentativa de extrapolar níveis séricos de NAb para proteção *in vivo*, ou para qualquer parâmetro clínico, representa uma correlação e não um efeito causal direto.

Por outras palavras, não existe nenhum estudo vacinal *in vivo* que demonstre formalmente que os NAb são o único mecanismo biológico responsável pelo controlo da infeção na ausência de células T. Especificamente no contexto do vírus da língua azul (BTV), os níveis de NAb nem sempre se correlacionam com o grau de proteção após vacinação com vacinas vivas contra BTV (Jeggo et al., 1983), e algumas preparações de vacinas inativadas podem conferir proteção na ausência de níveis detetáveis de NAb (Stott et al., 1989).

Para aprofundar esta questão, foi demonstrado um papel claro das células T CD4+ e CD8+ na proteção contra a infeção por BTV e na resposta à vacinação contra BTV (Rojas et al., 2011). Além disso, vacinas experimentais baseadas em vetores adenovirais demonstraram ser plataformas adequadas para indução de imunidade celular T na vacinação contra língua azul, sublinhando a relevância das respostas de células T para a proteção durante a infeção por BTV (Martín et al., 2015).

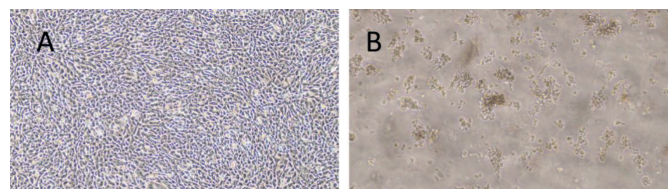


Figura 2: Teste de seroneutralização (SNT) realizado em células Vero 72 h após adição de vírus pré-incubado com soro (dados internos da SYVA). A: Células intactas (os NAb bloqueiam a entrada viral); B: Células mortas devido ao efeito citopático causado pela entrada viral.

Como salientado neste artigo, sejam neutralizantes ou não neutralizantes, os anticorpos são apenas uma parte da resposta imunitária gerada pelas vacinas. De facto, só muito raramente a imunidade humoral se desenvolve de forma independente das respostas celulares. Nesses casos, dirige-se predominantemente contra polissacáridos repetitivos, lipopolissacáridos e certos lípidos, produzindo principalmente anticorpos IgM.

Exemplos de agentes patogénicos que induzem este tipo de imunidade limitada incluem *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*.

Uma resposta T-independente pode ser rápida e útil contra certos tipos de bactérias, mas a sua duração, qualidade de anticorpos e geração de memória são limitadas, especialmente em populações vulneráveis, como os indivíduos jovens.

A força da unidade

A cooperação celular garante duas características essenciais das vacinas veterinárias: o início da imunidade (OOI, *onset of immunity*) e a duração da imunidade (DOI, *duration of immunity*). A colaboração entre células B e células T refere-se aos mecanismos celulares e moleculares pelos quais células T auxiliares CD4+ ajudam as células B, através de interações cognatas e produção de citocinas nos centros germinativos, para:

- sustentar a ativação precoce das células B e a produção de anticorpos;
- assegurar a proliferação e sobrevivência das células B;
- promover a diferenciação de células B de memória;
- assegurar a transição de células B de memória para plasmócitos durante respostas imunitárias secundárias.

Estas interligações imunitárias foram amplamente estudadas e, como resultado, dispomos hoje de um conhecimento cada vez mais preciso sobre os ligandos, recetores e vias intracelulares envolvidos, o que sustenta a eficácia vacinal a longo prazo (Janeway et al., 2001).

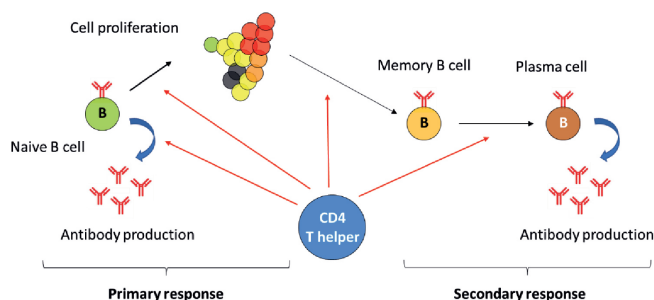


Figura 3. Interação entre células B e células T (setas vermelhas), uma colaboração fundamental para a geração eficaz de memória imunológica.

Conclusão

Em síntese, o desenvolvimento de vacinas relevantes e benéficas, bem como a identificação de correlatos de proteção *in vivo*, requerem a participação conjunta do maior número possível de componentes do sistema imunitário. Focar-se exclusivamente nos NAbS para reduzir a complexidade do sistema imunitário a mensagens convenientes, simplificadas — e frequentemente enviesadas comercialmente ou manipulativas — gera confusão e compromete a credibilidade de uma análise rigorosa dos dados.

Nota: Os Laboratórios SYVA estão comprometidos com a aplicação de elevados padrões no desenvolvimento de vacinas veterinárias, incluindo a interpretação imparcial e a divulgação pública de dados laboratoriais, pré-clínicos e clínicos. A SYVA está convicta de que a deturpação, bem como a publicação seletiva e a comunicação enviesada de resultados, são, em geral, prejudiciais para o setor. A utilização de estratégias eticamente questionáveis para obter vantagem comercial sobre concorrentes pode aumentar o retorno económico, mas à custa de danificar a imagem pública que veterinários, clientes e autoridades possam ter das empresas veterinárias.

Referências

- Abbas A., Lichtman A.H., Pillai S. and Henrickson S. *Cellular and Molecular Immunology*, 11th Edition, 2025.
- Janetzki S. Immune monitoring technology primer: the enzyme-linked immunospot (Elispot) and Fluorospot assay. *J Immunother Cancer*. 2015 Jul 21;3:30.
 - Janeway CA Jr, Travers P, Walport M. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York: Garland Science, 5th edition, 2001.
 - Jeggo M.H., Wardley R.C., Taylor W.P. Host response to bluetongue virus. In: Compans R.W., Bishop D.H.L. (Eds.), *Double-stranded RNA Viruses*, Elsevier, New York, USA, 1983, pp. 353–359.
 - Martin V., Pascual E., Avia M., Peña L., Valcárcel F., Sevilla N. Protective Efficacy in Sheep of Adenovirus-Vectored Vaccines against Bluetongue Virus Is Associated with Specific T Cell Responses. *PLoS One*. 2015 Nov 30;10(11):e0143273.
 - Rojas J.-M., Rodríguez-Calvo T., Peña L., Sevilla N. T cell responses to bluetongue virus are directed against multiple and identical CD4+ and CD8+ T cell epitopes from the VP7 core protein in mouse and sheep. *Vaccine*. 2011;29(40):6848–6857.
 - Stott J.L., Osburn B.I., Barber T.L., Sawyer M.M. Immunological response of sheep to an experimental inactivated BTV vaccine. *J Am Vet Med Assoc*. 1979;175:611–615.
 - Worwa G., Chaignat V., Feldmann J., Thür B. Detection of neutralising antibodies against bluetongue virus serotype 8 by an optimised plasma neutralisation test. *J Virol Methods*. 2013;188(1–2):168–174.