

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

FERNANDA SILVA TONETTI

Vacinas recombinantes: vantagens e desafios

Ribeirão Preto

2022

FERNANDA SILVA TONETTI

Vacinas recombinantes: vantagens e desafios

Versão original

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a obtenção
da graduação de bacharel em Farmácia-
Bioquímica

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Elisa Maria de
Sousa Russo

Ribeirão Preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte. A indicação do trabalho para a Biblioteca Digital foi autorizada pela Comissão de Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças para continuar nos momentos difíceis.

Aos meus pais Mara e Eduardo, pelo amor incondicional, por sempre confiarem no meu potencial, por me apoiarem e pelo apoio emocional.

À professora Elisa Maria de Sousa Russo pela orientação, paciência e pela oportunidade que me deu de fazer parte de sua equipe de laboratório.

Às minhas amigas Milene, Luana e Letícia, por alegrarem os meus dias, pelas conversas, pelo apoio e pelos momentos juntas.

Ao meu namorado Nathan, por sempre me incentivar nos meus sonhos, acreditar em mim e por me apoiar a não desistir.

Ao meu amigo Felipe, por me ajudar com suas experiências e dicas, pelas boas conversas e risadas.

À minha psicóloga Gabriela, por seu imenso carinho e apoio.

Aos meus colegas do laboratório Cito-Imuno e CENPRE, pelas conversas, dicas e aprendizados que me foram concedidos durante o percurso.

RESUMO

TONETTI, F. S. **Vacinas recombinantes: vantagens e desafios.** 2022. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A vacinação, tendo como objetivo a imunização prévia do indivíduo de forma eficiente, é o método de prevenção contra doenças infecciosas mais importante e de bom custo-benefício na área da saúde. Devido aos programas de vacinação pelo mundo, a incidência de várias doenças fatais foram drasticamente diminuídas. A maior parte das vacinas atualmente administradas são de primeira geração, utilizando microrganismos inteiros atenuados ou inativados, que apesar de serem eficazes, apresentam desafios quanto à sua segurança. A aplicação de ferramentas biotecnológicas têm contribuído para o desenvolvimento de formulações mais seguras e eficazes, refletindo na descoberta de novos antígenos, adjuvantes, vetores e sistemas de entrega. Vacinas recombinantes de segunda geração e as vacinas gênicas ou de terceira geração vêm ganhando espaço na ciência, ampliando o arsenal e possibilidades de vacinas. Vários tipos de vacinas recombinantes estão hoje em uso, em estudo ou em fases avançadas de testes contra diferentes agentes infecciosos. Essa monografia tem como objetivo a discussão de vantagens e desafios das vacinas de segunda e terceira geração.

Palavras-chave: Proteínas recombinantes. Vacinas. Sistema imune. Imunogenicidade. Subunidade. Epítipo. Ácido nucleico.

ABSTRACT

TONETTI, F. S. **Recombinant vaccines: advantages and challenges**. 2022. Monograph (Final paper) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Vaccination, with the objective of efficiently immunizing populations, is the most important and cost-effective method of preventing infectious diseases in the health area. Due to vaccination programs around the world, the incidence of several fatal diseases has been drastically reduced. Most vaccines currently administered are first-generation which employ attenuated or inactivated whole microorganisms. Despite being effective, they present challenges in terms of safety. The application of biotechnological tools has contributed to the development of safer and more effective formulations, reflecting on the discovery of new antigens, adjuvants, vectors, and delivery systems. Second-generation recombinant vaccines and genetic or third-generation vaccines have been gaining ground in science, expanding the range and possibilities of vaccines. Several types of recombinant vaccines are currently in use, under study, or in advanced stages of testing against different infectious agents. This monograph aims to discuss the advantages and challenges of second and third-generation vaccines.

Keywords: Recombinant proteins. Vaccines. Immune System. Immunogenicity. Subunit. Epitopes. Nucleic acid.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	6
1.1 Vacinas	6
1.2 Tecnologia do DNA recombinante	10
1.3 Tecnologia do DNA recombinante na área da saúde	12
2 DESENVOLVIMENTO	13
2.1 Vacinas: tipos, como atuam e exemplos	13
2.1.1 Vacinas de subunidade	13
2.1.1.1 Vacinas com proteínas recombinantes	13
2.1.1.2 Vacinas VLPs	15
2.1.2 Vacinas de DNA	21
2.1.3 Vacinas de RNA	26
2.1.5 Vacinas de vetores virais	33
3 CONCLUSÃO	36

1. INTRODUÇÃO

1.1 Vacinas

As vacinas são consideradas um dos maiores avanços da ciência na área da saúde. Seu principal objetivo é estimular o organismo humano a uma resposta do sistema imune de maneira segura em um posterior encontro com o patógeno, sendo eficazes na profilaxia a futuras infecções. As vacinas ativas são aquelas que estimulam o sistema imune a produzir anticorpos específicos por meio da resposta humoral e/ou respostas imune celulares. As vacinas passivas são aquelas que causam proteção transitória contra o antígeno ou a doença e são preparadas com anticorpos ou células do sistema imunológico de um indivíduo que já respondeu à estimulação direta através da administração do antígeno, sendo administradas antes, durante ou perto do tempo de infecção ou potencial exposição. Um exemplo de imunização passiva é pela transfusão de plasma convalescente. Com a pandemia de Covid-19, uma das técnicas utilizadas foi a transfusão do plasma de um paciente curado para indivíduos infectados. O plasma de pacientes curados anticorpos produzidos pelo sistema imunológico quando houve a infecção (CHAVES E FRANZÃO, 2020).

Vacinas são a forma mais efetiva e de melhor custo-benefício para prevenir milhões de casos de doenças, deficiências ou mortes, sendo uma importante aliada no controle, combate e erradicação de doenças, pois protegem tanto quem recebe a vacina quanto a comunidade como um todo por proteção indireta. As vacinas são responsáveis por evitar entre 2 e 3 milhões de óbitos por ano e, se a cobertura a nível mundial fosse bem sucedida, poderiam ser evitadas adicionais 1,5 milhões de mortes (SOUSA *et al.*, 2019).

Mais de 300 anos se passaram desde que a primeira vacina foi descoberta empiricamente. A vacina surgiu no final do século 18, em um importante momento histórico de combate à varíola, uma doença viral extremamente grave, muito transmissível que figura como uma das doenças que mais mataram no mundo. Considerada um dos maiores avanços da ciência, a primeira vacina foi desenvolvida pelo médico inglês Edward Jenner (1749-1823), em 1796, tendo suas primeiras investigações publicadas em 1798 (JENNER, 1798). Em 1796, Jenner realizou uma experiência na qual retirou as pústulas de vaccínia das mãos de uma ordenhadora de sua cidade natal que sofria de cowpox (varíola bovina), inoculando-as no braço de uma criança de 8 anos que contraiu uma infecção benigna e 10 dias depois estava recuperado, praticando assim a primeira vacinação com capacidade protetora contra

a varíola humana. Dois meses após, Jenner inoculou o vírus da varíola humana (small-pox) na criança e a doença não se manifestou, o que mostrou que estava imune à varíola (BAZIN, 2008).

No século XIX, o francês Louis Pasteur, com o objetivo de realizar estudos laboratoriais para outros patógenos, conduziu experimentos de maneira mais científica e com maior segurança, afirmando o uso da vacina como um mecanismo efetivamente científico e baseado em evidências. Assim, a primeira vacina concebida e desenvolvida com base na microbiologia foi a vacina contra a raiva, produzida por Louis Pasteur (1822-1895) (SILVA, 2015).

Assim como a história da imunização no geral, a história da imunização no Brasil está atrelada à criação da vacina contra a varíola. A vacina desenvolvida pela metodologia criada por Jenner chegou de Portugal para o Brasil em 1804 trazida pelo Marquês de Barbacena, sendo colocada em prática na Bahia (HOMMA *et al.*, 2020). Por influência do médico sanitarista e pioneiro da infectologia, Oswaldo Cruz, a vacinação obrigatória por lei foi instituída em 31 de outubro de 1904, mas não foi bem aceita pela população, o que gerou a Revolta da Vacina no Rio de Janeiro (CRESCÊNCIO, 2010; ROTELI-MARTINS *et al.*, 2020). A população só aderiu em massa a vacinação, entendendo a importância das campanhas vacinais em 1907, quando Oswaldo Cruz ganhou reconhecimento internacional, recebendo a medalha de ouro na Exposição Internacional de Higiene de Berlim pelo trabalho de saneamento no Rio de Janeiro.

Na segunda metade da década de 1910, o Brasil passou por mudanças no quadro de saúde pública nacional. Com a gripe espanhola de 1918 que se espalhou durante a Primeira Guerra Mundial e pelo seus efeitos devastadores, a saúde pública passou a ser destaque nos debates. No Brasil, em 1918, surgiu a Liga Pró-Saneamento do Brasil, dirigida por Oswaldo Cruz, implementando uma forte reforma dos serviços de saúde pública e saneamento no Brasil (GAZÊTA, 2006).

Em 1930, no período Vargas, surgiu a criação de um ministério voltado para as áreas da saúde e da educação, que passou por reformas e reorganizações em 1941, quando o Departamento Nacional de Saúde passou a incorporar serviços de combate a endemias e controle de formação de técnicos em saúde pública (GAZÊTA, 2006).

Atualmente, a vacinação do Brasil é realizada por meio do Programa Nacional de Imunização (PNI), coordenado pelo Ministério da Saúde, formulado em 1973 e instituído oficialmente pela lei 6.259/75. O programa é citado como referência mundial no controle e erradicação de doenças infecciosas. O PNI tem por missão controlar e/ou erradicar doenças imunopreveníveis no território nacional, distribuindo vacinas para toda a população por meio do Sistema Único de Saúde (SUS). Ações planejadas e sistematizadas no país permitiram a erradicação da varíola em 1973 e da poliomielite em 1989, além do controle do sarampo, tétano neonatal, formas graves de tuberculose, difteria, tétano acidental e coqueluche (DOMINGUES *et al.*, 2020). O PNI é constantemente avaliado e atualizado.

No campo da vacinologia tem sido realizadas pesquisas que culminam no desenvolvimento de vacinas cada vez mais eficientes e seguras para a prevenção de diversas doenças. A maior parte das vacinas atualmente administradas são as vacinas de primeira geração, porém, com os avanços e a aplicação de ferramentas biotecnológicas, várias estratégias têm sido utilizadas para o desenvolvimento de diferentes tipos de vacinas, chamadas de segunda e terceira geração.

As vacinas de primeira geração, foram introduzidas principalmente no começo do século XX, empregando em sua constituição patógenos inteiros, podendo ser vivos e atenuados ou mortos e inativados, sendo assim, incapazes de se multiplicar, mas ainda apresentando sua estrutura e componentes, preservando a capacidade de estimular o sistema imunológico. Alguns exemplos são a vacina BCG contra tuberculose (microrganismo atenuado) e a vacina contra a *Bordetella pertussis* contra a coqueluche (microrganismo inativado) (BLOCK *et al.*, 2021; MELO, 2019). As vacinas com microrganismos atenuados são consideradas melhores por simularem o curso natural da infecção. As vacinas com microrganismos inativados muitas vezes requerem o uso de adjuvantes para aumentar a imunogenicidade e requerem mais de uma dose, por provocarem uma resposta imune mais limitada se comparado com as vacinas que utilizam microrganismos atenuados.

A grande questão das vacinas de primeira geração é o fato de que a atenuação dos microrganismos pode, em teoria, ser revertida, trazendo risco para os indivíduos, uma vez que ainda não se conhece os métodos pelos quais isso acontece. Esse tipo de vacina tem seu uso limitado por pacientes imunocomprometidos por doenças como HIV ou pacientes que recebem drogas imunodepressivas.

As vacinas de segunda geração, ou de subunidades, surgiram com a observação de que, para alguns patógenos, a proteção poderia ser obtida após a indução de anticorpos voltados para um único alvo, podendo ser toxoides, proteínas e polissacarídeos purificados. Essas vacinas que não usam microrganismos vivos atenuados ou inativados em sua composição são potencialmente mais seguras (SANTOS *et al.*, 2020). Avanços na biotecnologia e na tecnologia do DNA recombinante permitiram a produção de peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes, propiciando que eles sejam produzidos em grande quantidade e usados como vacina (BALESTIERI, 2006). A segurança de uso e o retorno financeiro desperta interesse acerca da geração de vacinas de subunidades que utilizam antígenos recombinantes, como por exemplo, a vacina para o controle da hepatite B, a primeira vacina recombinante aprovada, e, mais recentemente, a vacina preventiva contra infecção do vírus do papiloma humano (HPV) (RIBEIRO, 2007; DINIZ, 2010).

As vacinas de terceira geração, também chamadas de vacinas gênicas, são as que mais se diferenciam das outras gerações vacinais. Essas vacinas foram descobertas empiricamente na década de 1990. Ao realizar estudos para terapia de reposição gênica, obteve-se a expressão de proteínas em miócitos após inocular vetores plasmidiais via intramuscular, e observou-se que DNA plasmidiais podiam transfectar células animais diretamente (WOLFF *et al.*, 1990). Assim, houve a exploração do uso de DNA plasmidiais contendo genes que codificam para proteínas antigênicas do patógeno para induzir resposta imune no hospedeiro, as chamadas vacinas de ácido nucleico ou vacinas gênicas. Esse campo da vacinologia gênica se estabeleceu com estudos demonstrando a imunização de camundongos à infecção do vírus influenza A após injeção intramuscular de vacinas baseadas em DNA (ULMER *et al.*, 1993). As vacinas de terceira geração empregam em sua constituição informação genética do patógeno responsável pela codificação de proteínas típicas que representam antígenos relevantes para a proteção, passando a expressar a proteína exógena, estimulando o sistema imune do paciente. Isso é possível pela introdução de genes ou seus fragmentos que codificam antígenos potencialmente imunogênicos, em vetores virais ou em DNA plasmidial (JÚNIOR *et al.*, 2004).

As vacinas de terceira geração também englobam as vacinas de RNA que tiveram grande impacto na pandemia da Covid-19. A Pfizer e BioNTech produziram a vacina Cominarty® baseada em mRNA (RNA mensageiro) que instrui a célula do hospedeiro a produzir as proteínas do antígeno S (uma parte da proteína da espícula exclusiva do SARS-

CoV-2). Foi aprovada pela FDA em 23 de agosto de 2021 (FDA, 2021). A ideia de usar RNA em vacinas já existia, o que permitiu que os pesquisadores acelerassem muitos estágios de pesquisa e desenvolvimento das vacinas.

Para todas os tipos de vacinas citados existem requisitos de autoridades regulatórias como a FDA (Food and Drug Administration), a EMA (European Medicines Agency) e ANVISA para especificações exatas da composição da vacina e dos mecanismos para obter imunidade.

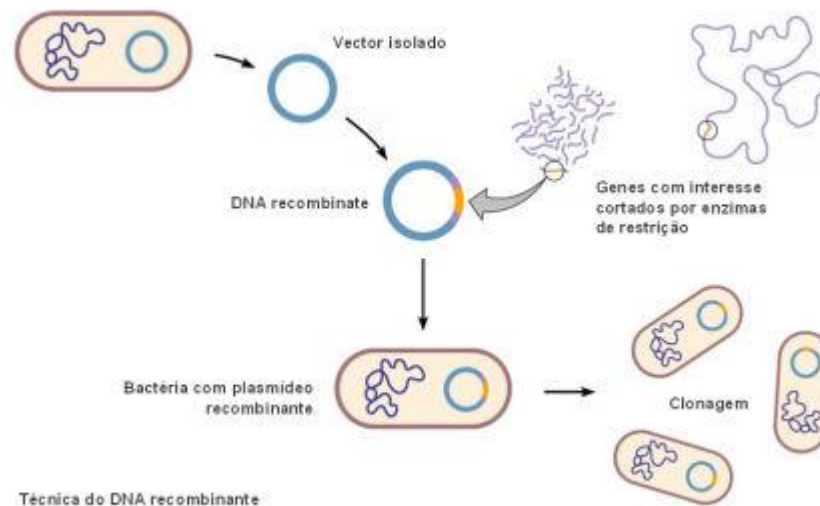
Neste trabalho serão apresentados as vantagens, desafios e alguns exemplos de vacinas recombinantes sendo estudadas e as já disponíveis no mercado.

1.2 Tecnologia do DNA recombinante

A tecnologia do DNA recombinante (TDR) data de 1972, quando o pesquisador Paul Berg, ao utilizar enzimas de restrição, que são capazes de reconhecer e cortar uma sequência de pares de bases específicas do DNA, obteve sucesso ao ligar posteriormente com ligases, duas cadeias genéticas diferentes, uma provinda de DNA do fago λ contendo o operon da galactose de *E. coli* inserindo-os no DNA de um vírus SV40 (JACKSON *et al.*, 1972).

Essa tecnologia permite a manipulação e a junção de dois materiais genéticos ou sequências específicas providas de diferentes organismos para gerar produtos de diferentes finalidades. Resumidamente, há a seleção e isolamento do gene a ser clonado (o inserto), depois a seleção de um elemento transportador apropriado e compatível (o vetor) e a ligação do material genético a ele por meio de enzimas ligase. A molécula recombinante é introduzida em uma célula hospedeira e é capaz de se multiplicar autonomamente, fazendo com que o material genético recombinante seja transferido de células mães às células filhas. Posteriormente, faz-se a seleção de células hospedeiras modificadas e que incorporaram o vetor (Figura 1). Essa seleção é feita por meio de antibióticos específicos no meio e isso é possível pois o vetor confere resistência a esses antibióticos, fazendo com que as bactérias que o incorporaram, sobrevivam e cresçam no meio seletivo.

Figura 1 – Tecnologia do DNA recombinante.



Resumidamente, há a seleção e isolamento do gene a ser clonado (o inserto), depois a seleção de um elemento transportador apropriado e compatível (o vetor) e a ligação do material genético a ele por meio de enzimas ligase. A molécula recombinante é introduzida em uma célula hospedeira e é capaz de se multiplicar autonomamente, fazendo com que o material genético recombinante seja transferido de células mães às células filhas. Figura retirada de SALSA, 2006.

Com o avanço dessa tecnologia, os pesquisadores da empresa Genentech obtiveram a insulina humana recombinante em quantidades razoáveis por meio de engenharia genética. (FERRO, 2010). A insulina humana foi a primeira proteína humana recombinante (aprovada em 1982) feita em bactérias e com sequência idêntica à do peptídeo pancreático humano (STRACHAN *et al.*, 2013). Esse tipo de medicamento apresenta maior segurança do que a extraída do pâncreas de animais, pois acarreta menos reações imunológicas pelos usuários e diminui os riscos de infecções transmitidas pelos animais (zoonoses).

A tecnologia do DNA recombinante surgiu possibilitando isolar genes específicos a partir do DNA de diferentes fontes, tornando possível a recombinação gênica entre espécies diferentes e abrindo a possibilidade de criação de organismos novos. A obtenção de proteínas por essa técnica facilitou a obtenção delas, uma vez que é um processo eficiente e de maior rendimento se comparado com a extração das proteínas de suas fontes naturais, possibilitando a produção em escala industrial. Antes da TDR, as proteínas obtidas de suas

fontes naturais e apresentavam risco de segurança e limitações de qualidade, como por exemplo, o hormônio de crescimento proveniente de glândula pituitária de cadáveres ou a insulina provinda do pâncreas triturado de porcos. Ainda, qualquer desvio no processo de obtenção poderia modificar a forma final da proteína, consequentemente fazendo com que ela perdesse sua ação terapêutica (REIS *et al.*, 2009).

Com o crescente avanço e conhecimento dessa técnica, atualmente pode-se aplicá-la em diversos estudos e na área de biotecnologia industrial, englobando áreas como os setores da indústria química, ambiental, agroindústria, e principalmente a área da saúde, incluindo a produção de vacinas recombinantes, foco do presente trabalho.

1.3 Tecnologia do DNA recombinante na área da saúde

Além do sucesso da primeira droga recombinante, a insulina humana, na indústria farmacêutica e na área da saúde como um todo, a TDR abrange atualmente vários setores. As proteínas recombinantes estão sendo usadas no suporte à pesquisa e ao desenvolvimento (P&D) farmacêutico, desenvolvimento de biofármacos, kits diagnósticos, vacinas, anticorpos monoclonais, proteínas terapêuticas com atividade enzimática ou regulatória (aumentado a atividade de algumas vias ou fornecendo uma nova função ou atividade), proteínas com atividades específicas (podendo interferir em uma molécula ou organismo, ou transportando outros componentes ou proteínas), entre outros (WALSH, 2018; GARCIA, 2021; REIS *et al.*, 2009).

Os avanços em biotecnologia permitiram o surgimento de novas ferramentas que alavancaram o processo de P&D farmacêutico, possibilitando a identificação mais precisa de alvos para o tratamento de doenças complexas (REIS *et al.*, 2009).

Pela tecnologia TDR, são produzidos biofármacos (fármacos produzidos por rota biotecnológica) de primeira e segunda geração, e anticorpos monoclonais. Os fármacos de primeira geração são cópias de proteínas humanas endógenas para reposição de proteínas. Os biofármacos de segunda geração são constituídos de proteínas modificadas por meio de alterações relativamente pequenas que alteram suas propriedades terapêuticas, podendo assim, por exemplo, controlar a duração do efeito terapêutico (NUNES, 2014). Os anticorpos monoclonais podem ser usados para direcionar um medicamento para uma célula ou tecido específico, uma vez que podem carregar toxinas para o agente causador da doença (REIS *et al.*, 2009).

Na área de kits diagnósticos, visa-se encontrar métodos diagnósticos rápidos e de baixo custo. Com o emprego da biotecnologia, foi possível reduzir custos de diagnósticos, permitindo o surgimento de testes rápidos, de utilização simples e leitura fácil, que não exigem pessoal qualificado ou equipamento para leitura. Além disso, tornou possível testes menos invasivos, podendo até mesmo ser realizada a identificação de alguns tipos de câncer pela amostra sanguínea. (REIS *et al.*, 2009).

O uso da tecnologia do DNA recombinante para a produção de vacinas de segunda e terceira geração é realizado como uma alternativa mais segura em relação às vacinas de primeira geração.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Vacinas: tipos, como atuam e exemplos

2.1.1 Vacinas de subunidade

As vacinas de subunidade são produzidas apenas com partes específicas (subunidades) antigênicas do microrganismo causador da doença e capazes de ativar uma resposta imune apropriada, não recebendo o microrganismo em si. A composição de vacinas desse tipo são normalmente bem definidas, com o antígeno podendo ser um polissacarídeo, proteína ou toxoide, os quais podem ser por isolamento diretamente de microrganismos patogênicos, podem ser sintéticos ou obtidos de maneira recombinante. A produção de vacinas de subunidades isoladas de microrganismos requer purificação do imunógeno de grandes quantidades do organismo patogênico, o que não é isento de riscos e custos significativos, portanto, uma alternativa mais viável economicamente é a obtenção de subunidades pela tecnologia do DNA recombinante.

2.1.1.1 Vacinas com proteínas recombinantes

A primeira vacina de subunidade foi aprovada pelo FDA em 1986, a vacina contra hepatite B (vacina Recombivax HB), sintetizada em *S. cerevisiae*. Pesquisadores observaram que a proteína de superfície do capsídeo era a proteína mais imunogênica do vírus, então o gene dessa proteína foi isolado e clonado em um plasmídeo que posteriormente foi introduzido na levedura para sua produção recombinante (Valenzuela *et al.*, 1982; LILJEQVIST E STÅHL, 1999).

O princípio básico dessas vacinas recombinantes é que o gene codificador da proteína (subunidade) deve ser desenhado e clonado em um vetor de expressão e introduzido em um segundo organismo, normalmente não patogênico, que irá produzir a proteína desejada.

O método de produção varia de acordo com o tipo de vacina de subunidade sendo produzida (GOMEZ E ROBINSON, 2018). Em geral, primeiro é necessário a obtenção do gene desejado clonado em um vetor de expressão para introdução em um organismo hospedeiro com capacidade de expressão dessa proteína. Portanto, há a necessidade da construção do gene e sua otimização, selecionando a região mínima requerida para induzir respostas imunes. Após o design do gene do antígeno com os sítios de restrição flanqueados, ele deve ser sintetizado usando a tecnologia do DNA recombinante (BURTON, 2017). Um vetor de expressão específico deve ser selecionado ou projetado levando em consideração o tipo de sistema de expressão (célula hospedeira) a ser utilizado. O sistema de expressão a ser utilizado depende das características do antígeno expresso, considerando também o nível de expressão, a necessidade ou não de modificações pós-traducionais, a produção em larga escala e os custos acerca da produção (DERTZBAUGH, 1998). As proteínas podem ser expressas em culturas de células de bactérias, leveduras, mamíferos, plantas ou insetos, ou através de plantas e animais transgênicos (DEMAIN E VAISHNAV, 2009).

Depois de expressa pelo sistema de expressão, a proteína é então purificada e concebida com outros componentes da vacina, como adjuvantes e conservantes. Ainda, pode-se utilizar nanocarreadores (entre 100 e 500 nm) como sistemas transportadores para aumentar a antigenicidade de conjugados, também induzindo respostas imunes adaptativas e respostas inatas (SILVA, 2016; NETO, 2018).

No geral, os agentes das vacinas de subunidade são englobados pelas células apresentadoras de antígenos (*antigen-presenting cells* - APCs), onde as proteínas são enviadas para processamento no sistema endolisossomal, sendo digeridas gerando peptídeos e então se associam às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex* – MHC) do tipo II. O complexo peptídeo-MHC II estimula as células T helper (Th) ao invés de células T citotóxicas. Por esse motivo, respostas de linfócitos T citotóxicos (*cytotoxic T lymphocytes* – CTLs) não ocorrem (YANKAUCKAS *et al.*, 1993; DAVIS *et al.*, 1993). As células T helper ajudam a ativar células B para a produção de anticorpos e células de memória (LIU, 2003).

As vacinas de subunidade podem ser administradas por vias intramuscular, subcutânea, intradermal e intranasal (POLLET *et al.*, 2021).

As vantagens das vacinas de subunidade são muitas: são mais seguras do que vacinas inativadas ou atenuadas pois não apresentam o microrganismo patógeno em sua composição (DU *et al.*, 2008); riscos associados à contaminação por componentes tóxicos são excluídos ((MOYLE AND TOTH, 2013); pela utilização da tecnologia do DNA recombinante, há um controle maior nos processos de produção e purificação, e também um controle maior dos componentes da vacina (ANDERSSON, 2000); efeitos adversos não menores ou inexistentes, uma vez que os componentes da vacina são conhecidos (HANSSON *et al.*, 2000).

Apesar de suas vantagens, as vacinas de subunidade apresentam algumas dificuldades. As vacinas de subunidade proteicas podem sofrer degradação proteolítica da proteína heteróloga ou sofrer depuração renal, mas hoje se estudam estratégias que podem minimizar a proteólise (CROFT E PURCELL, 2011). Em segundo lugar, podem apresentar baixa imunogenicidade e baixa capacidade de estimular respostas imunes potentes se comparada com formulações tradicionais de células inteiras (PULENDRAN, 2011), uma vez que essas vacinas contém um número limitado de componentes capazes de estimular o sistema imune (DEMENTO *et al.*, 2011). Por isso, são necessários adjuvantes e doses de reforço para eficiência da vacina de subunidade. Em terceiro lugar, a produção de tais vacinas requer processos produtivos caros em larga escala (LILJEQVIST E STÅHL, 1999).

Alguns exemplos de vacinas de subunidade no mercado incluem PedvaxHIB contra *Haemophilus influenzae* tipo B e Engerix-B contra hepatite B. Ainda, com a Covid-19, a vacina NVX-CoV2373 desenvolvida pela Novavax foi aprovada pela Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA) no Reino Unido e pelo Centers of Disease Control and Prevention (CDC) nos Estados Unidos. Essa vacina é formada a partir de fragmentos da proteína spike do SARS-CoV-2.

2.1.1.2 Vacinas VLPs

As partículas semelhantes a vírus (virus-like particles – VLPs) são um tipo de vacina de subunidade, são bionanoestruturas multiméricas (de 20 a 200 nm), às vezes multiproteicas, de ocorrência natural, que são montadas a partir de proteínas estruturais virais apresentando uma semelhança morfológica com o vírus de origem, mas incapazes de

causar infecções ou replicação por não possuírem o genoma viral intacto, melhorando significativamente seu perfil de segurança em relação a outras vacinas vivas ou atenuadas. São baseadas em uma estrutura de superfície imunogênica altamente repetitiva e de alta densidade de proteínas de superfície viral e a retenção de captação celular e vias de processamento imunológico associadas ao vírus de origem (Al-Barwani *et al.*, 2014). Sua captação pelas células é facilitada pelas proteínas virais funcionais, o que garante uma entrada celular eficiente, garantindo também o direcionamento específico do tecido, determinado pela origem do vírus (CHROBOCZEK *et al.*, 2014).

Na década de 1960, foi observada a existência natural de VLPs, ao descobrir algumas partículas virais identificadas como a proteína do capsídeo do vírus da hepatite B que se arranjavam na forma de vírus porém sem haver qualquer material genético (BLUMBERG *et al.*, 1965). Subsequentemente, foram descobertas VLPs do vírus da hepatite B capazes de induzir respostas imunes no hospedeiro (BAYER *et al.*, 1968). Desde então, modelos foram obtidos para entender a montagem de VLPs *in vitro* (BRADY E CONSIGLI, 1978; LI *et al.*, 1997) devido ao sucesso da expressão e purificação *in vitro* da principal proteína do capsídeo do papilomavírus humano (HPV) (HAGENSEE *et al.*, 1993; KIRNBAUER *et al.*, 1992; LI *et al.*, 1997), ganhando mais atenção dos pesquisadores para o uso de VLPs em vacinas (EDMAN *et al.*, 1981; MCALEER *et al.*, 1984).

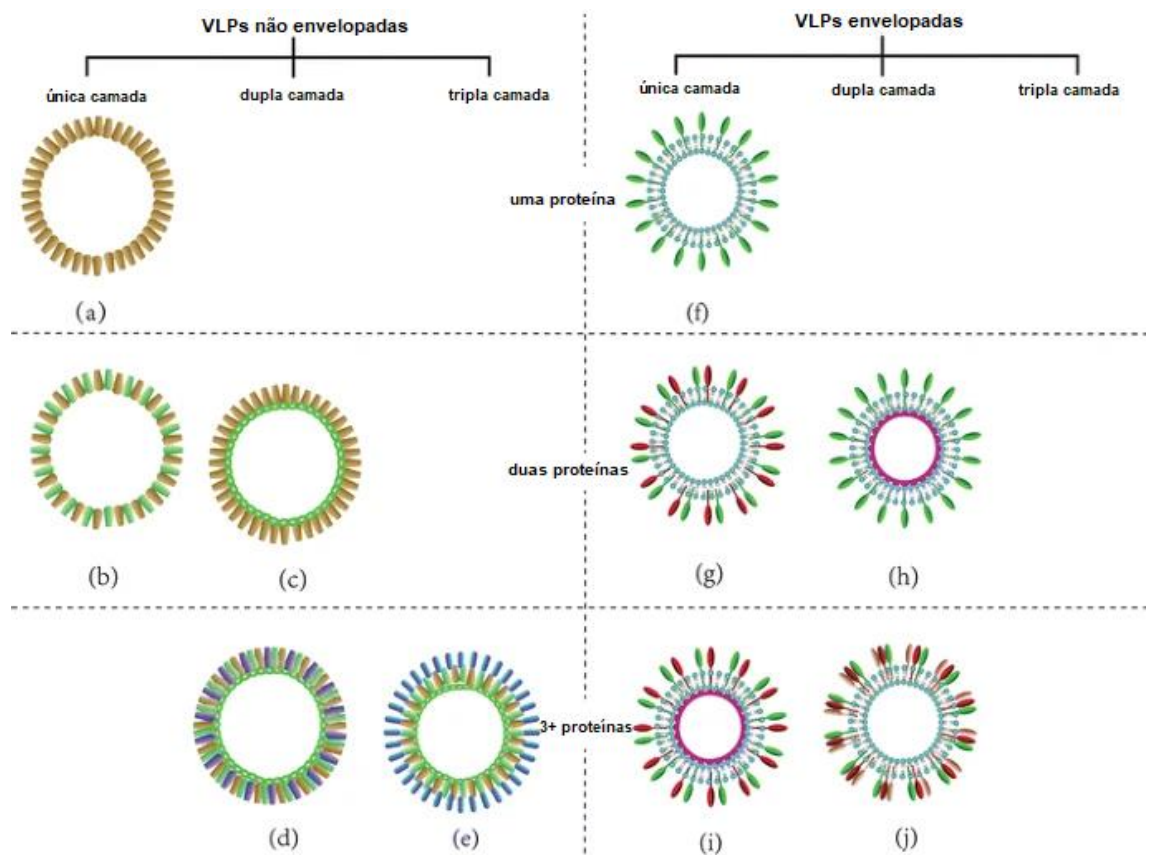
A primeira vacina recombinante baseada em VLP foi a vacina HBsAg produzida por levedura (Engerix-B®), aprovada pelo FDA (KEATING E NOBLE, 2003).

As proteínas estruturais de vários vírus são capazes de automontagem autônoma em VLPs. Elas interagem com a formação de estruturas globulares, icosaédricas ou semelhantes a bastonetes. Até agora, as proteínas estruturais de vários vírus foram obtidas em sistemas de expressão heterólogos procarióticos ou eucarióticos, ou montados sob condições livres de células, e quase todos se mostraram capaz de formar VLPs (SYOMIN e ILYIN, 2019).

As partículas semelhantes a vírus são diversificadas, levando a uma ampla variedade de aplicações e podem ser classificadas de dois modos: envelopadas, consistindo em proteínas da matriz envelopadas em uma membrana lipídica derivada do hospedeiro de expressão, ou não envelopadas, com glicoproteínas embutidas no lipídeo, sendo categorizadas ainda como VLPs de proteína de um ou vários capsídeos (Figura 2). O capsídeo pode ser modificado via inserção genética ou conjugação química que facilita a

exibição multivalente de um antígeno de epítipo homólogo ou heterogêneo. Suas características nanométricas trazem propriedades que podem ser vantajosas: grande área superficial, aminoácidos acessíveis na superfície com porções reativas (por exemplo, resíduos de lisina e ácido glutâmico), estrutura espacial previsível e boa biocompatibilidade (YAN *et al.*, 2015).

Figura 2 – Classificação de diferentes partículas semelhantes a vírus com base no número de proteínas de superfície viral e na existência ou não de envelopes lipídicos.



Para VLPs não envelopadas: a) as VLPs não envelopadas de camada única montadas por uma proteína [por exemplo, VLPs de antígeno de núcleo de hepatite B (ROOSE *et al.*, 2013)]; b) As VLPs não envelopadas de camada única montadas por duas proteínas [por exemplo, VLPs de coronavírus SARS (MORTOLA E ROY, 2004)]; c) VLPs não envelopadas de duas camadas montadas por duas proteínas [Por exemplo, VLPs de papilomavírus L1 e L2 (MCKEE *et al.*, 2015)]; d) VLPs não envelopadas de duas camadas montadas por várias proteínas [por exemplo, VLPs FMDV (GUO *et al.*, 2013)]; e) VLPs de camada tripla montadas por várias proteínas [por exemplo, VLPs de rotavírus (PAREZ *et al.*, 2006)]. Para VLPs envelopadas: f) VLPs de camada única consistindo em uma proteína [por exemplo, VLPs de ectodomínio do vírus influenza da proteína de M2e (LEE *et al.*, 2014)]; g) VLPs de camada única consistindo em duas proteínas [por exemplo, VLPs de hantavírus (ACUNA *et al.*, 2013)]; h) VLPs de duas camadas consistindo em duas proteínas [por exemplo, VLPs de hepatite C (BELLIER E KLATZMANN, 2013)]; i) VLPs de uma camada consistindo em várias

proteínas [por exemplo, VLPs de coronavírus SARS (HO *et al.*, 2004)] e j) VLPs de duas camadas consistindo em várias proteínas. Figura adaptada de LUA *et al.* (2014).

Tanto as VLPs envelopadas quanto as não envelopadas podem ser classificadas ainda em VLPs de monocamada ou de multicamadas (JEONG E SEONG, 2017). As VLPs de monocamada geralmente consistem de uma única proteína do capsídeo do vírus, enquanto VLPs multicamadas são formadas a partir de múltiplas proteínas de capsídeo expressas simultaneamente.

A multimerização de proteínas do capsídeo em uma partícula requer a presença de ácido nucleico, enquanto para a montagem *in vitro*, um oligonucleotídeo curto de 7 a 10 nucleotídeos é suficiente (SYOMIN *et al.*, 2012). Portanto, para a produção de VLPs formadas por proteínas do capsídeo não há necessidade de RNA ou DNA do vírus infeccioso (ZHOU *et al.*, 2017).

As vacinas baseadas em VLP são capazes de induzir respostas imunes de células TCD4+ bem como células T citotóxicas (SAILAJA *et al.*, 2007; ROY E NOAD, 2008; NADMDARI *et al.*, 2017). Ainda, seu tamanho reduzido e sua semelhança ao vírus de origem permitem que as VLPs penetrem na linfa e sejam eficientemente aprisionadas pelas APCs (MOHSEN *et al.*, 2018)

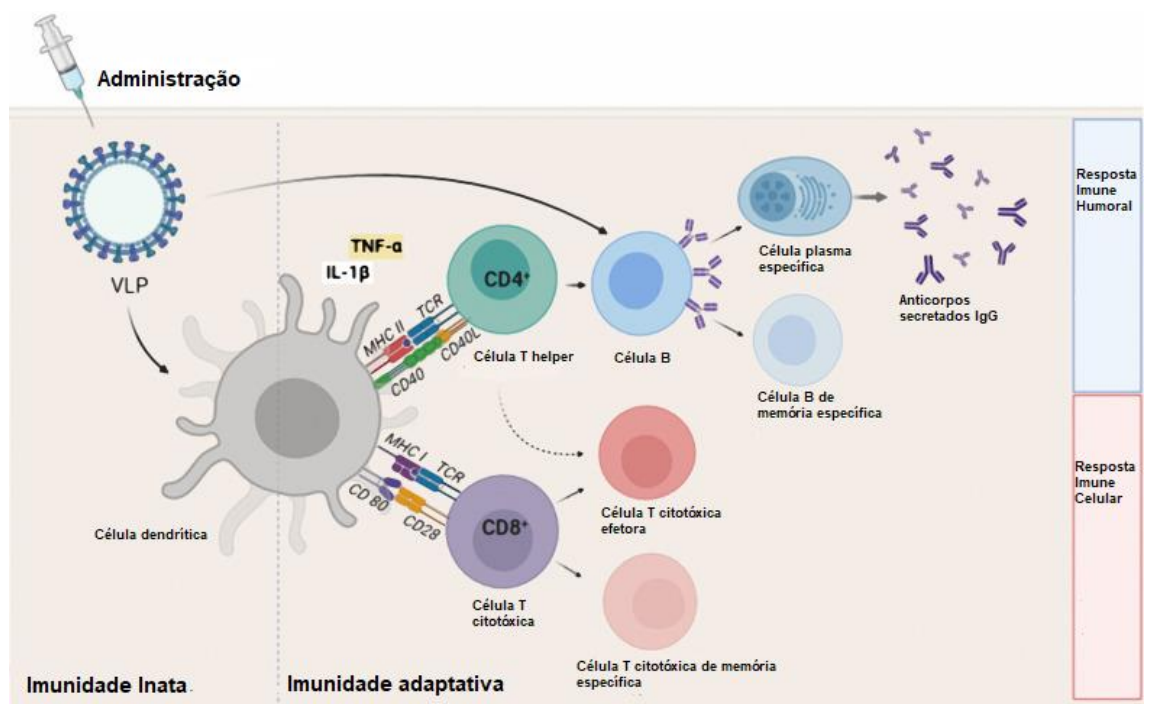
Primeiramente, VLPs de tamanho reduzido, menores que 20 nm, podem drenar diretamente do local de vacinação para tecidos linfáticos secundários, através dos poros dos vasos linfáticos (MANOLOVA *et al.*, 2008). As VLPs entre 20 nm e 200 nm são transportadas para os linfonodos ligados à superfície das células imunes mieloides (CINAMON *et al.*, 2007; CUBAS *et al.*, 2009). Enquanto que as VLPs maiores que 200 nm não podem drenar diretamente através dos poros para a linfa, portanto, elas requerem transporte ativo após a internalização por APCs no local de administração, como células dendríticas, macrófagos e células B (JEGERLEHNER *et al.*, 2002).

Em geral, as vacinas baseadas em VLPs são internalizadas pelas APCs por diferentes vias, mas as mais identificadas incluem fagocitose (YAN *et al.*, 2004), macropinocitose dependente de tamanho (WIN *et al.*, 2011) e endocitose mediada por receptor independente ou dependente de clatrina (CURETON *et al.*, 2010; EWERS *et al.*, 2005; FAUSCH *et al.*, 2003), incluindo endocitose semelhante ao que acontece com seu vírus parental. As VLPs ainda podem ser modificadas para que expressem ligantes específicos para captação

mediada por receptores correspondentes (MCINTOSH *et al.*, 2014; BANERJEE *et al.*, 2010).

Ao ser internalizadas pelas APCs por conterem padrão de vias de processamento de antígenos exógenos, as VLPs são digeridas dentro do fagolisossoma, e os peptídeos de antígenos resultantes são apresentados por moléculas do MHC II para células TCD4+ (células T helper) que possuem receptores específicos de células T (TCR) (Figura 3) (DONALDSON *et al.*, 2018). As VLPs apresentam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que podem ser reconhecidos e ativam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os receptores TLRs, receptores semelhantes a nod (NLRs) e receptores RLRs, cada um reconhecendo PAMPs específicos e padrões moleculares associados a danos (DAMPs). A ativação desses receptores culmina em uma variedade de sinais estimulatórios e a liberação de citocinas (DONALDSON *et al.*, 2018).

Figura 3 – Ativação da resposta imune adaptativa induzida por vacinas baseadas em VLP.



Após a administração, a VLP é absorvida por APCs, como células dendríticas, por fagocitose, sendo direcionadas para fagolisossomas que digerem os peptídeos, apresentando-os por MHC-I e II para ativação de células TCD4+ e TCD8+, respectivamente. As células TCD4+ (células T helper) interagem com células B para a ativação de respostas imunes humorais, culminando na secreção suficiente de anticorpos IgG pelas células plasmáticas, bem como a geração de célula B de memória. Já as células TCD8+ citotóxicas imaturas

(CTL) proliferam e se diferenciam em CTL efetoras e específicas de memória, para a indução de respostas da imunidade celular. Células efectoras TCD4⁺ aumentam a apresentação de antígenos por APC secretando citocinas e auxiliam os CTL ativadas. Figura adaptada de NOORAEI *et al.* (2012).

As citocinas liberadas e receptores coestimuladores das células T helpers continuam a ativação de células B. As células B ativadas se tornam plasmablastos que posteriormente migram para a região folicular dos linfonodos para formar centros germinativos, uma região especializada onde proliferam células B ativadas. Lá, os plasmablastos sofrem maturação guiados pela sinalização de células T auxiliares foliculares (TFH) (NUTT E TARLINTON, 2011; RADBRUCH *et al.*, 2006) resultando no desenvolvimento de células plasmáticas produtoras de anticorpos e células B de memória de longa duração.

A ativação de respostas imunes mediadas por células pode ocorrer e depende da apresentação cruzada de antígenos derivados de VLP por moléculas do MHC I. Células T citotóxicas CD8⁺ reconhecem através de seu TCR o complexo de antígeno-MHC I (Figura 3), e tornam-se preparadas para ativação, favorecendo a indução de células Th1 e CTLs efetoras (QUEIROZ *et al.*, 2021; DONALDSON *et al.*, 2018). Existem vários mecanismos conhecidos de apresentação cruzada em APCs, incluindo escape de antígeno do endossoma inicial, fusão do endossoma com o retículo endoplasmático e reciclagem de receptores MHC-I da superfície celular (RUEDL *et al.*, 2002; BARTH *et al.*, 2005; LECLERC *et al.*, 2007).

As vacinas baseadas em VLPs aprovadas para uso clínico têm utilizado várias vias de administração, incluindo subcutânea, intradérmica, intramuscular ou superfícies mucosas, porém a via de preferência é por injeção intramuscular (HERZOG, 2014).

As vantagens das vacinas VLP incluem alto nível de segurança, sem preocupações com biossegurança, uma vez que nenhum componente genético viral é introduzido durante a produção; a apresentação de epítopos conformacionais repetitivos na superfície, sendo mais semelhantes ao vírus nativo, e que desencadeiam respostas imunes eficientes (RAMQVIST *et al.*, 2007); são vacinas de rápida produção, desde o projeto até a expressão, para casos de endemias (COX, 2005); são fáceis de ser produzidas em grandes quantidades utilizando sistemas de expressão existentes (YAN *et al.*, 2015); são capazes de direcionar o transporte celular ao realizar modificações para introdução de ligantes de superfície (UNGARO *et al.*, 2013); são estruturas de grande área superficial e têm boa capacidade de cargas, sendo também auto-montadas por proteínas de estrutura viral em condições

adequadas, podendo ainda, encapsular inúmeras moléculas biológicas (PATEL E SWARTZ, 2011; WANG *et al.*, 2011; YANG E BURKHARD, 2012).

Os desafios das vacinas baseadas em VLPs giram em torno de sua estabilidade e purificação. As VLPs são mais estáveis que as vacinas de subunidade, porém, com a falta do genoma viral, elas se tornam instáveis quando as condições mudam, principalmente em processos downstream (DAI *et al.*, 2018). Há uma tendência natural de proteínas individuais adotarem estruturas de macromontagem incorretas. Isso apresenta complicações em etapas downstream, pois é necessário um controle das condições de processo, como concentrações de sais, íons e controle do pH, sendo essenciais para evitar a agregação aleatória de proteínas. A adição de mais proteínas na produção de VLPs necessita controle de qualidade que são inevitavelmente mais complexos porque coexistem uma mistura de proteínas montadas e não montadas. Pode haver degradação do produto devido à atividade proteolítica ou estabilidade diminuída devido à falta de uma determinada proteína estrutural na VLP. Há desafios quanto ao rendimento de produção, que podem ser insatisfatórios (VICENTE *et. al.*, 2011).

Vacinas comercializadas baseadas em VLP incluem vacinas contra hepatite B como Elovac B produzida pela Human Biologicals Insitute e Genevac B produzida pela Serum Institute; vacina contra hepatite E como Hecolin produzida pela Inovax; vacina contra papilomavírus humano como Gardasil produzida pela Meck. Ainda, existem vacinas em estágio de fases clínicas como VLP contra Influenza A e VLP contra Chikungunya (LACHANCE *et al.*, 2016; ACEVEDO-FLORES *et al.*, 2016). Contra Covid-19 há a vacina Covifenz da empresa Medicago, em fase clínica II/III, que foi desenvolvida utilizando tecnologia baseada em plantas (BELETE, 2021).

2.1.2 Vacinas de DNA

Vacinas de DNA são vacinas que carregam as informações necessárias para a produção das proteínas antigênicas, e são formadas a partir de um DNA plasmidial contendo o gene para o antígeno que é captado pelas células após a injeção, resultando em uma transfecção, isto é, a produção do antígeno pelas células do hospedeiro (LI *et al.*, 2012).

O DNA plasmidial é feito a partir da técnica do DNA recombinante, o gene codificador da proteína antigênica é inserido dentro de um vetor de expressão, sob o controle de um promotor viral forte, reconhecidos pelo hospedeiro mamífero. O plasmídeo

é introduzido em bactérias que são cultivadas para ser amplificado e depois o plasmídeo é purificado a partir da cultura. A vacina é formulada com adjuvantes necessários, e então inoculado no paciente a ser vacinado.

A primeira demonstração da possibilidade do uso de vacinas de DNA foi realizado por Ulmer e colegas, quando a imunização de camundongos com plasmídeos de DNA codificando para a nucleoproteína (NP) do vírus da influenza A, por injeções diretas do gene, resultou na indução de anticorpos específicos a NP e a subsequente proteção a um desafio com cepa heteróloga do vírus da influenza A, com sucesso de 90% de camundongos protegidos (ULMER *et al.*, 1993). Desde então, estudos têm mostrado que vacinas de DNA podem gerar tanto respostas imunes humorais quanto celulares (HASSON *et al.*, 2015), sendo amplamente divulgada pela comunidade científica como um método profilático para doenças infecciosas.

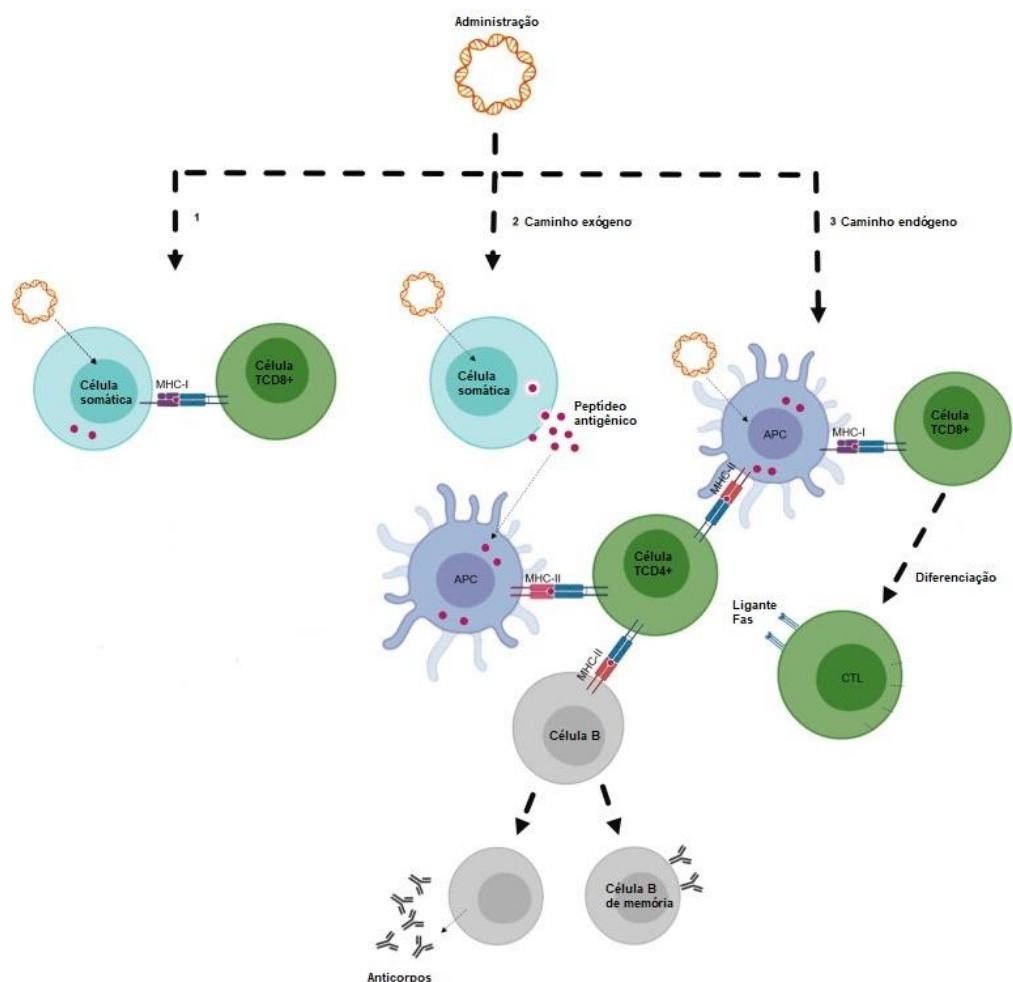
Quando a vacina de DNA é administrada, o plasmídeo recombinante precisa se translocar ao núcleo para que ocorra a transcrição e posterior tradução do antígeno no citoplasma da célula. Geralmente, as células transfectadas são APCs ou outras células residentes em tecidos, apesar dos miócitos também desempenhar um papel crucial (SILVEIRA *et al.*, 2020).

Pesquisas têm proposto três diferentes caminhos que levam à apresentação do antígeno (Figura 4). Como descrito por Eusébio e colegas, primeiro, o DNA codificante do antígeno pode ser expresso por células somáticas transfectadas, como miócitos e queratinócitos, sendo o antígeno apresentado por moléculas do MHC-I para células T CD8+ citotóxicas, porém, células somáticas não apresentam o antígeno com eficiência (LI *et al.*, 2016). Entretanto, um segundo caminho ocorre quando as células somáticas transfectadas liberam peptídeos via exossomos ou corpos apoptóticos, que são endocitados pelas APCs, como células dendríticas imaturas, e o peptídeo é processado e há apresentação cruzada através de moléculas do MHC-II e para células TCD4+ helper (LI *et al.*, 2012). No caso da via por MHC II, uma resposta humoral ocorre quando células B reconhecem o antígeno através das células TCD4+ helper, e como resultado, geram anticorpos e células B de memórias contra a proteína antigênica (COBAN *et al.*, 2013).

Um terceiro caminho, e talvez o mais significativo, é a transfecção direta de APCs, que culmina na expressão da proteína/peptídeo e no processamento endógeno do antígeno

por síntese no citoplasma. Os peptídeos digeridos são transportados para o lúmen do retículo endoplasmático e subsequentemente apresentados através de moléculas do MHC-II para células TCD4+ helper, e através de moléculas do MHC-I para células TCD8+ citotóxicas. Em caso de ativação concomitante, tanto do MHC I quanto MHC II, as APCs migram para o linfonodo de drenagem e podem iniciar a maturação de células T auxiliares CD8+ e CD4+ (JOFFRE *et al.*, 2009). Após a ativação de células TCD8+ citotóxicas, estas se diferenciam em células efetoras (CTLs), as quais têm papel importante nas vacinas pois causam apoptose de células infectadas. Enquanto que células Th restritas CD4+ fornecem ajuda para a ativação de células B para produção de anticorpos (LIU, 2003).

Figura 4 – Três diferentes caminhos que levam à apresentação do antígeno.



Três caminhos diferentes podem levar à apresentação de antígeno após a administração da vacina de DNA. (1) Miócitos ou queratinócitos transfectados têm o gene transcrito no núcleo com subsequente tradução no citoplasma. O antígeno lá é processado e apresentado por moléculas do MHC-I para ativação de CLTs. (2) O peptídeo ou proteína ainda pode ser liberado via exossomos ou corpos apoptóticos e endocitados por células

dendríticas imaturas que subsequentemente apresentam o material via MHC-II para células TCD4+ (células T helper) para a ativação de células B. (3) APCs podem ser transfectadas diretamente, processando e apresentando o peptídeo via MHC-I e MHC-II. Figura adaptada de EUSÉBIO *et al.* (2021).

A busca por vacinas que induzem respostas de CTLs é importante pois as respostas de CTLs podem ser dirigidas a epítomos de qualquer proteína do microrganismo patogênico, independentemente de sua localização, assim, a estratégia principal tem sido desenvolver respostas de CTLs contra proteínas conservadas do agente patogênico, a fim de desenvolver vacinas que sejam eficazes para uma gama ampla de cepas/variantes (LIU, 2003).

Além das vias citadas acima, plasmídeos recombinantes também induzem ativação da imunidade inata pelo reconhecimento de DNA de dita dupla (dsDNA) do esqueleto do plasmídeo bacteriano pela presença de motivos de dinucleotídeos CpG (YANG *et al.*, 2014). No citosol de células transfectadas, moléculas atuam como sensores de dsDNA que ativam as respostas imunes inatas através da cascata de sinalização STING-TBK1, levando a produção de interferons tipo I (IFNs) e citocinas inflamatórias (ORI *et al.*, 2017; KOBAYAMA *et al.*, 2013). Ainda, receptores Toll-like 9 (TLR9) são receptores para CpG do DNA, estimulando a expressão de moléculas que iniciam uma resposta inflamatória e ajudam a induzir respostas imunes adaptativas (NIGAR E SHIMOSATO, 2019).

Numerosas abordagens para entrega de genes têm sido reportadas. Administração por injeção intramuscular é a mais comumente técnica utilizada. Porém, essa técnica transfecta predominantemente miócitos, que não são APCs eficientes. Por essa razão, a administração intradérmica pelo bombardeamento de micropartículas de ouro revestidas de material genético têm sido explorada (JORRITSMA *et al.*, 2016). Alternativamente, direcionar a vacina de DNA para órgãos linfoides secundários é uma estratégia adequada para transfectar o maior número possível de APCs usando vias mucosas (oral, pulmonar, intranasal) ou intravenosa. Vários métodos físicos também foram desenvolvidos e testados clinicamente através da pele, incluindo abordagens sem agulha, como o bombardeamento gênico, eletroporação, injetores de jato e sistemas de microagulhas (EUSÉBIO *et al.*, 2021).

As vacinas de DNA apresentam algumas vantagens quando comparadas com vacinas tradicionais: são mais simples de construir por apresentarem baixo custo de produção uma vez que há simplificação da produção, uso de cultura de células, fermentação e purificação, sendo, portanto, mais econômicas para produção em larga escala quando comparado com às vacinas tradicionais (CAI *et al.*, 2009). As vacinas de DNA apresentam

maior estabilidade térmica em temperatura ambiente, não necessitando de cadeias de frio (EUSÉBIO *et al.*, 2021). Devido às mudanças pós-traducionais, promovem síntese de antígenos de forma similar ao que ocorre durante uma infecção natural, além de driblar dobras incorretas que podem acontecer em vacinas de subunidade proteicas, proteínas geradas em sistemas de expressão (YE *et al.*, 2020). Ainda, não há riscos associado à reversão à virulência, o que ocorre em vacinas vivas atenuadas.

Apesar das vantagens citadas, as vacinas de DNA apresentam alguns desafios a serem superados, que envolvem consequências desconhecidas da persistência a longo prazo do DNA plasmidial e da expressão de genes no hospedeiro. Um desafio que vem sendo bastante discutido é o risco potencial de integração do DNA plasmidial no genoma do hospedeiro. As consequências podem acarretar em inserção de um oncogene, ativação por inserção de um proto-oncogene hospedeiro ou desativação por inserção de um gene supressor do hospedeiro (KANO *et al.*, 2007). Outras preocupações são a possibilidade de induzir tolerância, autoimunidade, anafilaxia (ou hiperimunidade) bem como a possibilidade de induzir anticorpos anti-DNA (KHAN, 2009). No entanto, para validar a segurança das vacinas de ácido nucleico, são necessárias mais investigações a longo prazo. Apesar dos avanços na tecnologia de vacinas de DNA desde sua descoberta, a imunogenicidade inadequada continua sendo a maior limitação para o uso delas em humanos (GHAFARIFAR, 2018).

Embora as vacinas de DNA tenha vantagens e comparativos, elas estão apenas em estágios iniciais de desenvolvimento clínico, assim, não há exemplos de produtos licenciados para humanos, somente a aprovada vacina contra Covid-19, ZyCoV-D (DAUPHIN E ZIENTARA, 2007; ATHERTON *et al.*, 2016). A vacina contra Covid-19, ZyCoV-D, foi aprovada pelo órgão regulador de medicamentos da Índia no final de agosto de 2021 (SAMAL *et al.*, 2021). Outra vacina de DNA contra Covid-19 que está sendo estudada é a vacina INO-4800 da empresa Inoviom, que se encontra em fase clínica I (SMITH *et al.*, 2020). Para o uso em humanos, há vacinas em testes clínicos avançados, como a PENNVAX®-B contra HIV, a EP-1300 contra Malaria, INO-1800 contra Hepatite B, entre outras (LEE *et al.*, 2018).

2.1.3 Vacinas de RNA

Vacinas de RNA mensageiro (mRNA) são uma classe de vacinas compostas por uma sequência de mRNA que codifica uma proteína antigênica específica do patógeno. Uma vez que essas sequências são captadas pelas células, o antígeno é expresso pelo organismo e é reconhecido pelo sistema imunológico, levando à indução de respostas imunes desejadas (ALAMEH *et al.*, 2020). Assim como nas vacinas de DNA, nenhum patógeno vivo ou inativado é utilizado para construção, então, uma de suas vantagens sobre as vacinas de primeira geração é não ser possível a reversão à forma virulenta do patógeno, sendo, portanto, mais seguras nesse aspecto.

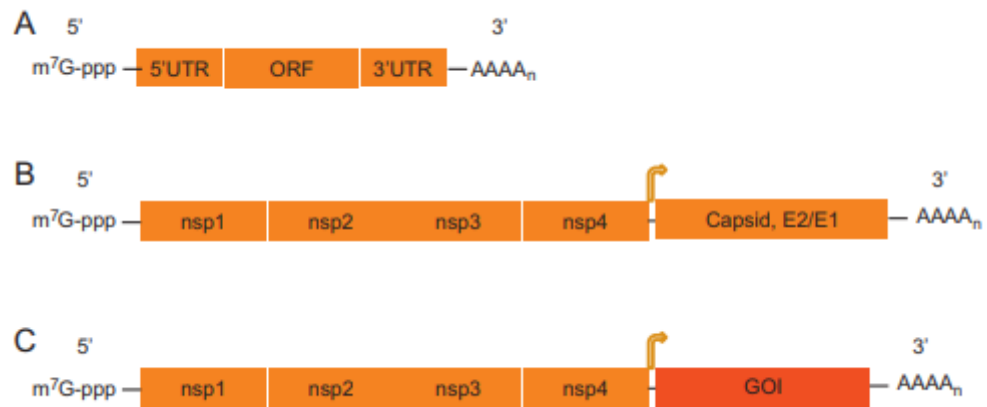
A primeira prova da eficácia de vacinas de mRNA data de duas décadas atrás, quando o pesquisador Wolff e colegas realizaram a injeção intramuscular de mRNA em camundongos codificando sequências de cloranfenicol acetiltransferase, luciferase e β -galactosidase (β gLucI β gA_n) e se obteve expressão *in situ* significativa de genes repórter nas células musculares. Nesse trabalho, obteve-se ainda uma comparação com a vacina de DNA plasmidial em doses similares (em massa), observando níveis similares de genes repórter, sugerindo eficácia equivalente entre os dois tipos de vacinas. (WOLFF *et al.*, 1990). Indução de respostas imunes contra o antígeno codificado foi relatado em outro trabalho (MARTINON *et al.*, 1993).

As vacinas de RNA podem ser de dois tipos: compostas por fragmentos de sequência de RNA mensageiro que codificam para a proteína antigênica ou ainda, replicons de RNA autoamplificadores baseados em proteínas não estruturais de alfavírus, flavivírus ou vírus de sentido negativo (como vírus do sarampo), com genes codificando para a proteína de interesse, sendo incorporados em lipossomos ou em micropartículas (PARDI *et al.*, 2018).

As vacinas de mRNA levam como vantagem sua simplicidade, ausência de quaisquer proteínas codificadas adicionais que possam ser alvos não intencionais de respostas imunes, e tamanho menor, no entanto, as células tendem a limitar a expressão de RNA presente para tradução, fazendo com que haja um nível transitório e baixo de expressão, necessitando de mais doses para proteção completa, além de tempo de meia vida curta e instabilidade. Esse tipo de vacina consiste no gene de interesse flanqueado pela extremidade 5' contendo também um cap terminal 5' e sequências não codificantes na extremidade 3' com uma cauda poli A [Figura 5(A)]. Esses elementos controlam a síntese

de proteínas, influenciando a estabilidade e acessibilidade aos ribossomos e a circulação e interação com a maquinaria de tradução, e esses elementos podem ser otimizados (PASCOLO, 2008). Essas sequências de elementos UTR 5' e 3' reguladores cis controlam a expressão gênica recrutando uma variedade de proteínas celulares para gerenciar as taxas de tradução e degradação do mRNA, respectivamente (BARRETT *et al.*, 2012; CHATTERJEE E PAL, 2009; PICKERING E WILLIS, 2005).

Figura 5 – Elementos estruturais de vacinas de mRNA e de replicon de RNA autoamplificador.



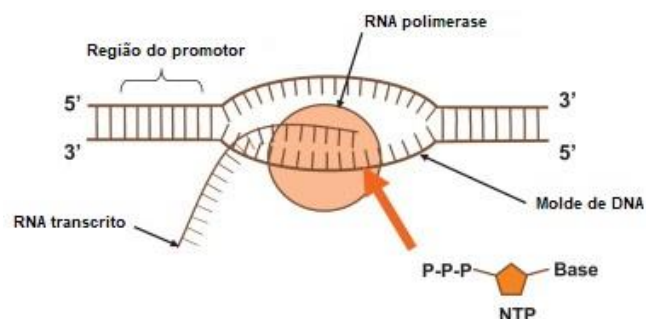
(A) Ilustração de um mRNA eucariótico contendo estrutura cap [m^7Gp_3N (n: qualquer nucleotídeo)], a região não traducional 5' (5'UTR), quadro de leitura aberta (open reading frame – ORF), a região não traducional 3' (3'UTR) e uma cadeia de 100-250 resíduos de adenosina (causa poli-A). (B) Ilustração de genoma de alfavírus de senso positivo contendo estrutura 5' cap, genes não estruturais (nsp1-4), promotor 26S subgenômico (seta aberta), genes estruturais (capsídeo e glicoproteínas E1 e E2) e uma cauda poli A 3'. (C) Ilustração de RNA autoamplificador derivado do genoma de alfavírus, excluindo os genes do capsídeo e das glicoproteínas E2/E1 que são substituídos pelo gene externo de interesse (GOI). Figura retirada de GEALL *et al.* (2013).

As vacinas de replicons são moléculas maiores que codificam fatores capazes de promover a amplificação, pois produzem RNA subgenômicos ao substituir os genes de proteínas estruturais pelo gene de interesse [Figura 5(C)], sendo, portanto, mais potentes que as vacinas de mRNA não replicadoras. Essas vacinas vêm como uma alternativa às vacinas de mRNA não replicador como maneira de melhorar a estabilidade, durabilidade e níveis de expressão. Apresentam os mesmos elementos básicos do mRNA (um cap, 5' UTR, 3' UTR e uma cauda poli A de tamanho variável).

As moléculas de mRNA auto replicadoras mais bem estudadas são derivadas do genoma de alfavírus [Figura 5(B)], como os vírus Sinbis e Semliki Forest (ATKINS *et al.*, 2008). A estrutura contém ORF grande que codifica quatro proteínas não estruturais (nsP1-4) e um promotor subgenômico, que permite a replicação do mRNA para codificar o antígeno da vacina. Genes de proteínas estruturais no genoma viral são substituídos pelos genes que codificam proteínas de interesse, tornando assim o mRNA incapaz de produzir um vírus infeccioso (ATKINS *et al.*, 2008).

As vacinas de mRNA são obtidas por transcrição enzimática *in vitro* (Figura 6) a partir de DNA plasmidial ou DNA linear por uma RNA polimerase de bacteriófago (T7, SP6 ou T3), ou ainda por meio de kits comerciais (YAMAMOTO *et al.*, 2009). As reações de transcrição *in vitro* geralmente contêm 1) molde de DNA linearizado, 2) trifosfatos de nucleotídeos (NTPs) para as quatro bases de ribonucleotídeos necessárias, 3) uma polimerase, 4) um inibidor de ribonuclease para inativar qualquer RNase, 5) uma pirofosfatase para degradar o pirofosfato (inibidor da transcrição), 6) MgCl₂ (que fornece Mg²⁺, cofator para polimerase) e 7) um tampão de pH contendo antioxidante e poliamina (GEALL *et al.*, 2013). Quando a reação está completa, o molde de DNA é degradado por tratamento com DNase, a reação é purificada e o RNA é recuperado usando métodos como precipitação e cromatografia.

Figura 6 – Reação de transcrição enzimática *in vitro* de um molde de DNA para a produção do RNA.



Um molde de DNA linearizado contendo uma sequência promotora da polimerase que permite a ligação da RNA polimerase, incorporando NTPs de uma maneira dependente da sequência à medida que a enzima lê da extremidade 5' para 3' e termina quando a enzima sai do molde. Figura adaptada de GEALL *et al.* (2013).

As vacinas de RNA são capazes de induzir respostas antigênicas específicas humoral e respostas celular em modelos de animais contra doenças infecciosas e não infecciosas. O mecanismo de ação de vacinas de mRNA não foi totalmente elucidado, mas acredita-se que envolve alguns dos mesmos mecanismos utilizados por vacinas de DNA para expressão e apresentação de antígeno aqui citado (ULMER *et al.*, 2012).

Primeiramente, o RNA é reconhecido como um potente estimulador da imunidade inata. Isso se deve ao fato de que, ao se administrar vacinas de mRNA auto replicadoras, durante a replicação de RNA no citoplasma e durante a transcrição *in vitro*, são gerados intermediários de dupla fita (dsRNA) que são potentes estimuladores da imunidade inata e normalmente não estão presente nas células (XU *et al.*, 2020).

Após a entrada na célula, os sensores de RNA endossomal e citosólico são ativados, sendo eles: família de receptores endossomais semelhantes a toll (TLRs) e família de receptores semelhantes ao gene-1 induzível por ácido retinóico (RIG-1) presente particularmente em APCs, ativando subsequentemente o interferon tipo 1. TLR-3 e RIG-I reconhecem intermediários de replicação viral, como os dsRNA, enquanto que TLR-7 induz a regulação positiva de quimiocinas e interferon I que recrutam células da imunidade inata para o local de administração (KALLEN *et al.*, 2013) e estimulam a resposta das células B através do aumento da apresentação do antígeno (ABLASSER *et al.*, 2009). A questão do mRNA ser auto-adjuvante pode ser uma faca de dois gumes, uma vez que a estimulação excessiva dos sensores e das respostas imunes estimuladas pelo mRNA no citoplasma pode induzir a degradação do RNA de fita simples ou silenciar sua expressão (CHAKRABARTI *et al.*, 2011; PARDI *et al.*, 2018), devido a presença de dsRNA que são reconhecidos como intermediários de replicação viral. Zhong *et al.*, demonstraram métodos de purificação para eliminar subprodutos de RNA de fita dupla durante a produção, reduzindo a imunidade inata e melhorando a eficácia de uma vacina contra o vírus Zika, resultando em nível de anticorpos altos e respostas de células T CD4+ e CD8+ contra antígeno-alvo do Zika.

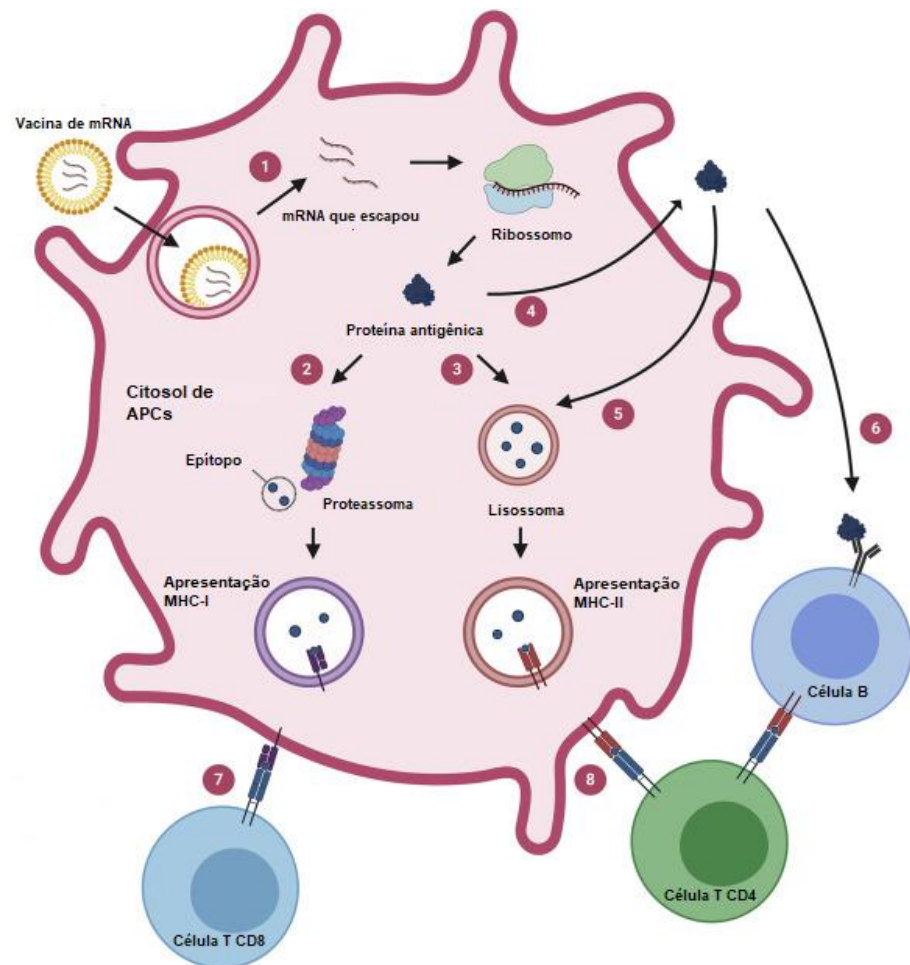
Outras vias de ativação da resposta imune envolvem a apresentação de peptídeos por moléculas de MHC, que seguem a mesma via das vacinas de DNA. A vacinação de mRNA leva à imunidade adaptativa em diferentes vias: 1) transfecção de células somáticas, 2) transfecção de células imunes nos tecidos nos locais da injeção e 3) transfecção de células imunes nos tecidos linfoides secundários, como linfonodos (LNs) e baço.

Após a transfecção de células somáticas (como miócitos) ou de células nos tecidos locais de injeção, principalmente APCs, o mRNA é transcrito e o antígeno produzido é degradado por proteassomas (Figura 6-2), os epítomos derivados do antígeno podem formar um complexo com as moléculas do MHC I para apresentação às células TCD8+ que se maturam em CLTs. Os miócitos também são capazes de ativar e transferir antígeno para as células dendríticas culminando também na apresentação por MHC I (LAZZARO *et al.*, 2015).

Igualmente desejável, acontece a ativação de células TCD4+. O mecanismo não é totalmente elucidado mas acredita-se que a apresentação do antígeno endógeno no MHC II pode ser mediada pela autofagia que está associada à degradação lisossomal de antígenos citosólicos (MÜNZ *et al.*, 2015) (Figura 7-3 e 5). Do mesmo modo, o antígeno pode ser degradado por proteassomas ou lisossomas, subsequentemente apresentado via MHC II, fazendo com que o antígeno seja secretado ou seja expresso de forma transmembrana por ação de peptídeos sinais codificados (RICHNER *et al.*, 2017; WALSH *et al.*, 2020; ESPESETH *et al.*, 2020).

Nos linfonodos (LNs) residem monócitos e células T e B virgens que são ativados e maturados. Os antígenos solúveis são capazes de alcançar os LNs e são reconhecidos diretamente por células B virgens levando a um reconhecimento mais eficiente dos antígenos (CARRASCO E BATISTA, 2006), enquanto que antígenos pequenos são carregados por monócitos e células dendríticas migratórias até os LNs, fornecendo os antígenos às células B virgens de maneira menos eficiente (LINDSAY *et al.*, 2019). Quando os antígenos se ligam aos receptores das células B (BCR) são internalizados por endocitose e apresentados no MHC classe II. Subsequentemente, as células B seguem para centros germinativos onde sofrem hiper-maturação somática e maturação por afinidade, e com a coestimulação de células T auxiliares, se proliferam e aprimoram a especificidade do BCR contra o antígeno. As células B de alta afinidade saem dos centros germinativos como células plasmáticas de vida longa ou células B de memória (DE SILVA E KLEIN, 2015; HEESTERS *et al.*, 2016)

Figura 7 - Mecanismos de respostas imunes induzidas por vacinas de mRNA.



(1) Escape endossomal de mRNA para o citosol após internalização mediada por endocitose. (2) A proteína do antígeno traduzida do mRNA exógeno é degradada em fragmentos no proteassoma, seguida pela apresentação do MHC-1. (3) A proteína do antígeno pode sofrer degradação lisossomal por meio de vários mecanismos, como autofagia e peptídeo sinal, seguido pela apresentação do MHC-II. (4) A proteína do antígeno pode ser destinada a se expressar extracelularmente na forma secretada ou ancorada na membrana. (5) O antígeno expresso extracelularmente pode ser retomado pelas APCs, direcionado à degradação lisossomal. (6) Em vez disso, o antígeno extracelular pode ser reconhecido pelo receptor de células B nas células B, levando à maturação das células B. (7) MHC-I apresenta o epítipo para células TCD8+ enquanto (8) MHC-II apresenta o epítipo para células TCD4+. Figura adaptada de KIM *et al.* (2021).

As vacinas de mRNA podem ser administradas para indução de respostas imunes contra antígenos específicos por várias rotas: intramuscular (PERCHE *et al.*, 2019; HASSETT *et al.*, 2019;), intradérmica (GOSWANI *et al.*, 2019), subcutânea (MARTINON *et al.*, 1993; OBERLI *et al.*, 2017), intranasal (MAI *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2016), intravenosa (VERBEKE *et al.*, 2019), intraesplênico (BROOS *et al.*, 2016) e intranodal (BOL *et al.*, 2015), bem como entrega pela pele por gene gun (QIU *et al.*, 1996; ABERLE *et al.*, 2011).

As vacinas de mRNA podem ser entregues nu, simplesmente purificadas em tampão, mas pode-se utilizar outras técnicas para aumentar a potência da vacina como entrega por partículas virais, formulações não virais envolvendo lipídeos, polímeros catiônicos (para driblar a hidrofobicidade e a forte carga líquida negativa do RNA que impede a captação pelas células), emulsões ou outros sintéticos, e também tecnologias de entregas físicas como gene gun e eletroporação *in situ*. Sistemas de entrega de vacinas de mRNA ao invés de usar o mRNA nu evitam que o RNA seja degradado por RNases nos tecidos quando exposto, o que pode limitar a captação de RNA funcional pelas células (PROBST *et al.*, 2007).

Apesar de as vacinas serem o melhor meio para se controlar doenças infecciosas com potencial pandêmico, o desenvolvimento de novas estratégias de vacinas podem levar mais de 10 anos para serem produzidas e disponibilizadas, desde a fase pré clínica até seu licenciamento (PRONKER *et al.*, 2013). As vacinas de RNA surgem como uma proposta que promete rápida produção, desenvolvimento e aprovação clínica. Isso se deve ao fato de poderem codificar qualquer sequência viral, precisando de processo mínimo para combater novas variantes e serem produzidas por transcrição *in vitro*, o que barateia o processo pois não necessita de custos com células e meio de cultura (ARMBRUSTER *et al.*, 2019). Após o sequenciamento do patógeno alvo, os candidatos de mRNA podem ser projetados e sintetizados muito rapidamente, gerando plataformas para próximas vacinas, uma vez que uma nova vacina diferirá apenas na sequência codificada do gene de interesse, enquanto sua formulação e método de entrega terão sido otimizados e licenciados no passado.

Além disso, ambos os tipos de vacina de mRNA, auto-amplificadores ou não, possuem outras vantagens como não possuir nenhum contaminante biológico e serem de fácil produção. Uma vez que não necessitam de alto custo devido à não necessidade de culturas de células, é uma plataforma genérica viável e de resposta rápida para possíveis patógenos emergentes em pandemias futuras (IAVARONE *et al.*, 2017). Têm como vantagem a não integração do RNA ao genoma do hospedeiro (WU E LI, 2021), e ainda, são traduzidas diretamente no plasma, não necessitando atravessar duas barreiras e chegar ao núcleo para transcrição, como é necessário com o DNA (MARUGGI *et al.*, 2019). E, diferente de vacinas de subunidade, a produção do antígeno *in situ* oferece grande versatilidade, garantindo localização intracelular, associação de membrana, modificações pós-traducionais, montagem supramolecular ou otimização estrutural direcionada do antígeno produzido (HOERR *et al.*, 2000).

Uma dificuldade expressa pela utilização de vacinas de mRNA é que as vacinas atuais requerem armazenamento em cadeia fria a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, o que torna a distribuição generalizada para climas mais quentes ou destinos rurais mais desafiadora. Pesquisas estão sendo realizadas para estabilização de formulações de mRNA em um estado líquido ou liofilizado (BLAKNEY, 2021; WU E LI, 2021). Outra dificuldade expressa por vacinas de mRNA que impedem a tradução bem sucedida dessas moléculas em antígenos é o seu tamanho muito grande e por ser intrinsecamente instável, sendo propenso à degradação por exonucleases como RNases nos tecidos alvos. Porém alguns desafios foram parcialmente resolvidos por modificação química do mRNA, e por diferentes estratégias de entrega, mas o delivery intracelular ainda apresenta um desafio (WADHWA *et al.*, 2020; ROSA *et al.*, 2021).

Exemplos de vacinas que estão em fase clínica 1 são: W_ova1 vaccine contra câncer de ovário, mRNA-1893 contra Zika Vírus, mRNA-1944 contra Chikungunya vírus. As vacinas que estão em fase clínica 2 são: mRNA-4157 contra melanoma cutâneo, Human CMV pp65-LAMP mRNA contra glioblastoma, entre outros exemplos (WADHWA *et al.*, 2020). Aprovadas para uso em humanos há a vacina Cominarty® contra Covid-19 e da Moderna (a mRNA-1273) (SMEDLEY, 2021).

2.1.5 Vacinas de vetores virais

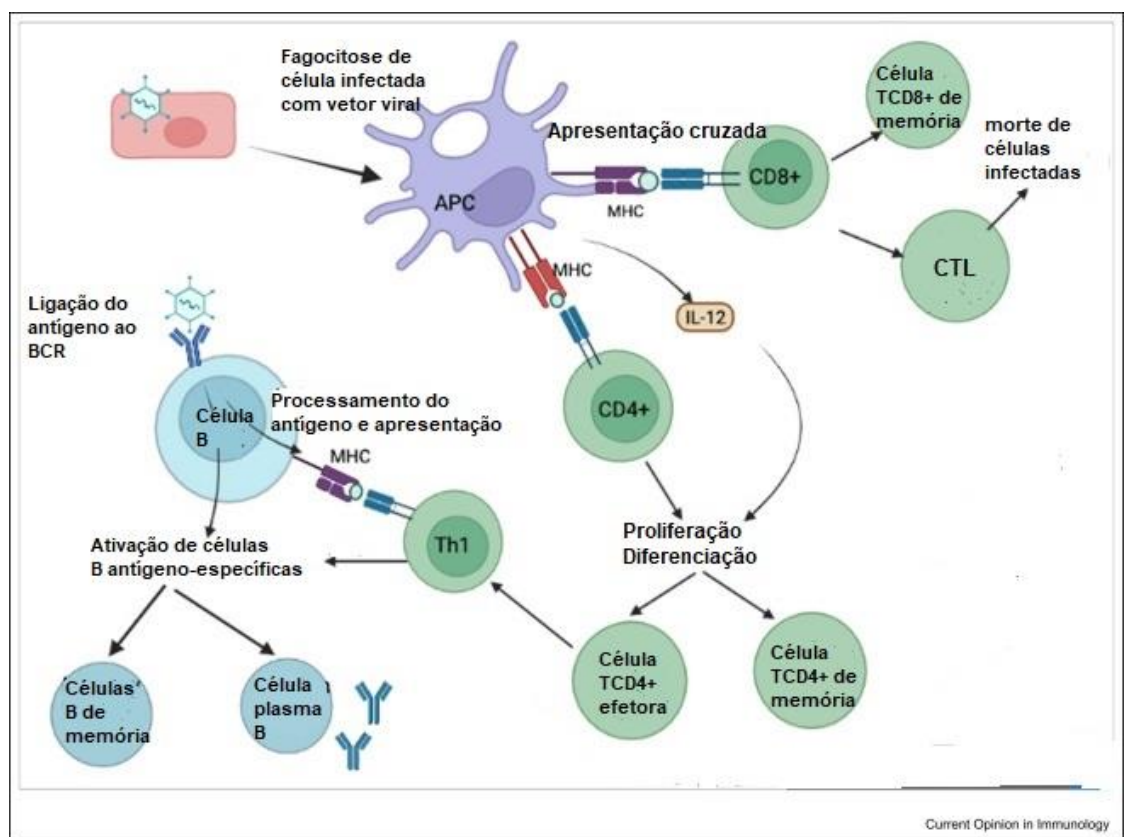
Vetores virais recombinantes (VVR) são constituídos por vírus não patogênicos, altamente atenuados, capazes de carregar informações genéticas para a produção de antígenos de outros patógenos quando inoculados em indivíduos vacinados. As vacinas que incluem vetores virais se baseiam na capacidade dos vírus de entrar nas células e utilizar a maquinaria celular para a expressão de antígenos próprios ou exógenos. Esse vírus não patogênico, portanto, atua como um veículo para levar a mensagem genética e inseri-la na célula hospedeira.

A primeira descrição publicada do uso de vírus recombinante como vetor viral foi o vírus vaccínia recombinante, projetado para expressar antígeno de superfície da hepatite B em células animais, induzindo uma resposta imune protetora contra desafio posterior (MOSS *et al.*, 1984). Desde então, vários vírus têm sido estudados e usados como carreadores de vacinas, como adenovírus, alfavírus, poxvírus, lentivírus, vaccínia vírus,

vírus do sarampo, vírus da estomatite vesicular, entre outros, e cada vetor tem suas vantagens e desvantagens (BRÅVE *et al.*, 2007; LUNDSTROM, 2021).

Os vetores virais se apresentam em diferentes formas, podendo transportar ácidos nucleicos (RNA ou DNA) de fita simples ou dupla, ter orientação positiva ou negativa, ser envelopados ou não envelopados. Alguns vetores podem se replicar no hospedeiro enquanto outros vetores são deficientes em replicação (HANKE, 2022).

Figura 8 – Resposta imune adaptativa em resposta à vacina de vetor viral.



A apresentação cruzada de antígeno ocorre em células apresentadoras de antígeno, por exemplo, células dendríticas após fagocitose de células infectadas. O antígeno é apresentado via moléculas do MHC às células T, estimulando a proliferação e diferenciação das células TCD4+ e CD8+. As células B são ativadas para células B de memória específicas de antígeno e células B plasmáticas por meio de mecanismos T-dependentes e T-independentes. A ligação do antígeno nativo ao BCR fornece sinais bioquímicos que iniciam a ativação da célula B independente das células T. A ativação dependente de células T ocorre quando o BCR internaliza o antígeno que é endocitado e processado em peptídeos apresentados pelas moléculas do MHC de classe II. As células T auxiliares as reconhecem e estimulam a ativação das células B. Figura modificada e baseada em MCCANN *et al.*, 2022.

O mecanismo para ativação da resposta imune pode variar dependendo do vetor utilizado, mas no geral, o mecanismo se comporta da seguinte maneira (Figura 8): depois que a vacina foi administrada, o vetor viral ou células infectadas com o vetor viral são fagocitadas por APCs, como células dendríticas. O gene é transcrito e traduzido em proteínas que são degradadas em peptídeos e se ligam às moléculas do MHC I, que são apresentados para células TCD8+, assim, tornando-os CTLs com a ajuda de citocinas. As células TCD8+ expandidas e diferenciadas (que se tornaram CTLs) facilitam respostas efetoras citotóxicas e podem causar apoptose em células infectadas (ERTL, 2016). Apesar de a via mais comum ser a apresentação de antígenos por moléculas do MHC I, uma vez que o vírus entra na célula e expressa antígenos intracelularmente, a apoptose é importante para transferir os antígenos para outras células, realizando assim a apresentação cruzada para moléculas do MHC II que apresenta o antígeno para células TCD4+, ativando-as (ALBERT *et al.*, 1998). Antígenos capturados por células B são apresentados em forma de peptídeos por moléculas do MHC II para células T helper foliculares (TFH) promovendo a diferenciação de células B para a produção de anticorpos e células de memória (SU *et al.*, 2013). Ainda, a resposta imune inata é ativada pelo reconhecimento de estruturas virais, como o capsídeo, culminando na produção de interferon α/β e respostas inflamatórias, ligando a imunidade inata à imunidade adaptativa (SHIRLEY *et al.*, 2020).

As vacinas de vetores virais podem ser administradas por diferentes vias: intramuscular (EWER *et al.*, 2016), intranasal (ROBERT-GUROFF, 2007), oral (LIEBOWITZ *et al.*, 2020), intradermal (DE GRUIJL *et al.*, 2006) e via aerossol (XU *et al.*, 2022).

No geral, as vacinas que utilizam vetores virais apresentam algumas vantagens como: transdução gênica de alta eficiência, entrega altamente específica de genes para células alvo, indução de respostas imunes robustas e aumento da imunidade celular, geralmente atingem alta imunogenicidade sem a necessidade de adjuvantes e apenas com uma dose e podem ser engenheirados para entregar antígenos para células ou tecidos específicos (URA *et al.*, 2014; TRAVIESO *et al.*, 2022).

Algumas limitações desse tipo de vacina incluem a limitação da resposta imune se houver imunidade pré-existente devido exposição prévia contra o vírus utilizado como vetor, sintomas adversos devido a viremia, preocupações de segurança devido a origem do vírus, risco de patogênese em indivíduos específicos (mais comum em vetores de

citomegalovírus), possível integração ao genoma do hospedeiro, necessidade de cadeias frias para armazenamento e obstáculos para produção (URA *et al.*, 2014; TRAVIESO *et al.*, 2022; SAMARANAYAKE *et al.*, 2021; WOOSLEY E GEISBERT, 2021).

As vacinas de vetores virais já em uso ou em ensaios clínicos incluem proteção contra vírus zika (ABBINK *et al.*, 2016), HIV (BAROUCH *et al.*, 2018), malária (RODRIGUES, 1998) e ebola (ZHU *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2017; KENNEDY *et al.*, 2017). Recentemente, a vacina Vaxzevria (ChAdOx1) da AstraZeneca baseada em vetor viral de adenovírus símio que expressa a proteína spike SARS-CoV-2 S foi aprovado para uso em humanos no Reino Unido e em outros países. A vacina Sputnik V da Moscow's Gamaleya Institute baseada em vetor viral de adenovírus não replicante contendo genes específicos para proteína spike também foi aprovada na Rússia e em outros países (PRITCHARD *et al.*, 2021; COVID-19 VACCINE TRACKER, 2022).

3 CONCLUSÃO

Não é difícil imaginar o impacto que as vacinas têm desde os seus primórdios, uma vez que estimadamente 300 a 500 milhões de pessoas morreram devido à endemia de smallpox e hoje não há uma morte porque o vírus foi erradicado devido à vacinação em 1978 (MÜHLEMANN *et al.*, 2020). Desde então, outras doenças como a poliomielite e a rubéola foram erradicadas em alguns países, além do controle de outras doenças como sarampo, tétano neonatal, formas graves de tuberculose, entre outras, e a qualidade e expectativa de vida dos seres humanos foram aumentadas (DOMINGUES *et al.*, 2020). A vacinação é uma segurança coletiva, não apenas individual, pois também protege indivíduos não vacinados indiretamente, contribuindo para reduzir a transmissibilidade por meio de uma menor carga viral.

Apesar da evidente importância das vacinas, atualmente muitas pessoas questionam sua eficácia e chegam a ser contra seu uso com o movimento “*antivax*”, um movimento contra o uso de vacinas. Esse movimento cresce também às custas da disseminação de informações falsas nos veículos de comunicação não oficiais, que os indivíduos não se certificam da veracidade antes de compartilhá-las e segui-las. Isso é preocupante uma vez que pode acarretar no retorno de doenças que se tornaram raras ou inexistentes devido ao uso de vacinas, como o retorno do sarampo que o Brasil presenciou em 2018 e 2019, resultando em mortes, incluindo bebês (PEREIRA *et al.*, 2019).

Muito se discute acerca da segurança no uso de vacinas, tanto na comunidade científica e de profissionais de saúde, quanto pela população em geral, devido à ocorrência de eventos adversos pós-vacina. Porém, cabe ressaltar que as vacinas passam por processos rigorosos de testes em várias etapas, incluindo ensaios clínicos com milhares de pessoas, e esses ensaios são justamente para identificar quaisquer preocupações de segurança. Ademais, uma das maiores prioridades da OMS é desenvolver e implementar padrões para garantir que as vacinas sejam seguras e eficazes. Portanto, as vacinas aprovadas foram rigorosamente avaliadas por segurança, e os ensaios clínicos mostraram que são seguras e eficazes para seu uso.

Da mesma forma que a vacinação foi fundamental para erradicação e controle de várias doenças, foi também fundamental da pandemia de Covid-19, uma vez que reduziu o número de pessoas com sintomas graves, internações em hospitais e mortes pelo doença. Plataformas de vacinas já existentes como vacinas de DNA, mRNA e de vetores virais voltaram a ser foco, sendo estudadas e pesquisadas com mais afinco. Porém, como todas as plataformas de vacina citadas aqui já foram estudadas e apresentam avanços durante anos, a ideia de usá-las e os conceitos e métodos necessários para isso já existiam, o que permitiu que os pesquisadores acelerassem muitos estágios de pesquisa e desenvolvimento para as vacinas contra o Covid-19.

É necessário reforçar que nenhuma plataforma de vacinas citadas é melhor que a outra, todas apresentam vantagens, desvantagens e limitações, e podem ser melhor escolhidas e aplicadas dependendo de cada situação. É um fato que as vacinas modernas de segunda e terceira geração são um avanço na forma como as vacinas são utilizadas, apresentando várias vantagens se comparadas com as vacinas de primeira geração: de vírus inteiros inativados ou atenuados. Vantagens como maior segurança, melhor custo-benefício, redução de efeitos adversos e versatilidade são pontos importantes. Porém, ainda há uma grande carga de trabalho e estudo a ser desenvolvido para aprovação e uso eficiente dessas vacinas.

REFERÊNCIAS

- ABBINK, P. *et al.* Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. **Science (New York, N.Y.)**, v. 353, n. 6304, p. 1129–1132, 9 set. 2016.
- ABERLE, J.H.; ABERLE, S.W.; KOFLER, R.M.; MANDL, C.W. Humoral and cellular immune response to RNA immunization with flavivirus replicons derived from tickborne encephalitis virus. **Journal of Virology** 2005;79(24):15107–13.
- ABLASSER, A.; POECK, H.; ANZ, D.; BERGER, M.; SCHLEE, M.; Kim, S. *et al.* Selection of molecular structure and delivery of RNA oligonucleotides to activate TLR7 versus TLR8 and to induce high amounts of IL-12p70 in primary human monocytes. **J Immunol.** 2009;182(11):6824-33
- ACEVEDO-FLORES, M.; DIAZ, C.; HOEN, B. *et al.* Trial for safety and immunogenicity of a chikungunya vaccine, VRC-CHKVLP059-00-VP, in healthy adults. NCT02562482. National **Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)**. 2016.
- ACUNA, R.; CIFUENTES-MUNOZ, N.; MARQUEZ, C.; BULLING, M.; KLINGSTROM, J.; MANCINI, R.; LOZACH, P.Y.; TISCHLER, N.D. Hantavirus Gn and Gc glycoproteins self-assemble into virus-like particles. **J Virol.** 2013
- ALAMEH, M.-G.; WEISSMAN, D.; PARDI, N. Messenger RNA-Based Vaccines Against Infectious Diseases. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, 17 abr. 2020.
- AL-BARWANI, F.; DONALDSON, B.; PELHAM, S.J. *et al.* Antigen delivery by virus-like particles for immunotherapeutic vaccination. **Ther Deliv.** 2014 Nov;5(11):1223–1240.
- ALBERT, M. L.; SAUTER, B.; BHARDWAJ, N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. **Nature**, v. 392, n. 6671, p. 86–89, mar. 1998.
- ANDERSSON, C. Production and delivery of recombinant subunit vaccines. **Europe PMC**, 2000.
- ARMBRUSTER, N.; JASNY, E.; PETSCH B. Advances in RNA vaccines for preventive indications: A case study of a vaccine against rabies. **Vaccines**, 7 (2019), p. 132

ATHERTON, M.J.; MORRIS J.S.; MCDERMOTT M.R.; LICHTY B.D. Cancer immunology and canine malignant melanoma: A comparative review. **Vet. Immunol. Immunop.** 2016, 169, 15–26.

ATKINS, G. J.; FLEETON, M.N.; SHEAHAN, B. J. Therapeutic and prophylactic applications of alphavirus vectors. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, 10 (2008), p. e33

BALESTIERI, F. Immunologia. Barueri, SP: **Manole**; 2006.

BANERJEE, D.; LIU, A.P.; VOSS, N.R. *et al.* Multivalent Display and Receptor-Mediated Endocytosis of Transferrin on Virus-Like Particles. **ChemBioChem**, v. 11, n. 9, p. 1273–1279, 7 maio 2010.

BAROUCH, D. H. *et al.* Evaluation of a mosaic HIV-1 vaccine in a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2a clinical trial (APPROACH) and in rhesus monkeys (NHP 13-19). **The Lancet**, v. 392, n. 10143, p. 232–243, jul. 2018.

BARRETT, L.W.; FLETCHER, S.; WILTON, SD. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 69 (21) (2012), pp. 3613-3634

BARTH, H.; ULSENHEIMER, A.; PAPE, G.R. *et al.* Uptake and presentation of hepatitis C virus-like particles by human dendritic cells. **Blood**, v. 105, n. 9, p. 3605–3614, 1 maio 2005.

BAYER, M. E.; BLUMBERG, B. S.; WERNER, B. Particles associated with Australia Antigen in the Sera of Patients with Leukaemia, Down's Syndrome and Hepatitis. **Nature**, v. 218, n. 5146, p. 1057–1059, jun. 1968.

BAZIN, H.; JENNER, E. The Eradication of Smallpox: Edward Jenner and The First and Only Eradication of a Human Infectious Disease. [s.l.] **Elsevier Science**, 2000.

BELETE, T. M. Review on Up-to-Date Status of Candidate Vaccines for COVID-19 Disease. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 14, p. 151–161, jan. 2021.

BELLIER, B.; KLATZMANN, D. Virus-like particle-based vaccines against hepatitis C virus infection. **Expert Review of Vaccines**, v. 12, n. 2, p. 143–154, fev. 2013.

BLAKNEY, A. K.; IP, S.; GEALL, A. J. An Update on Self-Amplifying mRNA Vaccine Development. **Vaccines**, v. 9, n. 2, p. 97, 28 jan. 2021.

BLOCK, M. M.; SILVA, S. E. M. Vacina BCG: uma abordagem geral. 7 dez. Disponível em: <https://repositorio.animaeducacao.com.br/handle/ANIMA/18959>. Acesso em: ago. 2022

BLUMBERG, B. S. A “New” Antigen in Leukemia Sera. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 191, n. 7, p. 541, 15 fev. 1965.

BOL K. F.; FIGDOR C. G.; AARNTZEN E. H.; WELZEN M. E.; VAN ROSSUM M. M.; BLOKX W. A. *et al.* (2015). Intranodal vaccination with mRNA-optimized dendritic cells in metastatic melanoma patients. **Oncoimmunology** 4, e1019197.

BRADY, J. N.; CONSIGLI, R. A. Chromatographic separation of the polyoma virus proteins and renaturation of the isolated VP1 major capsid protein. **Journal of Virology**, v. 27, n. 2, p. 436–442, 1978.

BRÅVE, A. *et al.* Vaccine Delivery Methods Using Viral Vectors. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 1, p. 18–32, fev. 2007.

BROOS, K.; VAN DER JEUGHT, K.; PUTTEMANS, J.; GOYVAERTS, C.; HEIRMAN, C.; DEWITTE H. *et al.* (2016). Particle-mediated intravenous delivery of antigen mRNA results in strong antigen-specific T-cell responses despite the induction of type I interferon. **Mol. Ther. Nucleic Acids** 5, e326.

BURTON, D. R. What Are the Most Powerful Immunogen Design Vaccine Strategies? **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 9, n. 11, p. a030262, 3 fev. 2017.

CAI, Y.; RODRIGUEZ, S.; HEBEL H. DNA vaccine manufacture: scale and quality. **Expert Rev. Vaccines** 8(9), 1277–1291 (2009).

CARRASCO, Y.R.; BATISTA, F.D. B cell recognition of membrane-bound antigen: an exquisite way of sensing ligands. **Curr. Opin. Immunol.**, 18 (2006), pp. 286-291,

CHAKRABARTI, A.; JHA, B.K.; SILVERMAN, R.H. New insights into the role of RNase L in innate immunity. **J Interf Cytokine Res** (2011) 31:49–57

CHATTERJEE, S.; PAL, J. K. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. **Biology of the Cell**, 101 (5) (2009), pp. 251-262

CHAVES, K.; FRANZÃO, L. Plasma convalescente: como funciona a técnica no combate à Covid-19. **CNN Brasil**, São Paulo, 17 ago. 2020. Disponível em: <<https://www.cnnbrasil.com.br/saude/plasma-convalescente-como-funciona-a-tecnica-no-combate-a-covid-19/>>. Acesso em: 19 out. 2022.

CHROBOCZEK, J.; SZURGOT, I.; SZOLAJSKA, E. Virus-like particles as vaccine. **Acta Biochim Pol.** 2014;61(3):531-9. Epub 2014 Sep 18. PMID: 25273564.

CINAMON, G. *et al.* Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. **Nature Immunology**, v. 9, n. 1, p. 54–62, 25 nov. 2007.

COBAN, C.; KOBIYAMA, K.; JOUNAI, N.; TOZUKA, M.; ISHII, K.J. DNA vaccines—a simple DNA sensing matter? **Hum Vaccines Immunother**, 9 (2013), pp. 2216-2221

COX, M. M. J. Cell-based protein vaccines for influenza. **Current Opinion in Molecular Therapeutics**, v. 7, n. 1, p. 24–29, 1 fev. 2005.

CRESCÊNCIO, C. L. Revolta da vacina: higiene e saúde como instrumentos políticos. **BIBLOS**, v. 22, n. 2, p. 57–73, 2008

CROFT, N. P.; PURCELL, A. W. Peptidomimetics: modifying peptides in the pursuit of better vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v. 10, n. 2, p. 211–226, fev. 2011.

CUBAS, R. *et al.* Virus-like Particle (VLP) Lymphatic Trafficking and Immune Response Generation After Immunization by Different Routes. **Journal of Immunotherapy**, v. 32, n. 2, p. 118–128, fev. 2009.

CURETON, D. K. *et al.* The Length of Vesicular Stomatitis Virus Particles Dictates a Need for Actin Assembly during Clathrin-Dependent Endocytosis. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 9, p. e1001127, 30 set. 2010.

DAI, S.; WANG, H.; DENG, F. Advances and challenges in enveloped virus-like particle (VLP)-based vaccines. **Journal of Immunological Sciences**, v. 2, n. 2, 25 abr. 2018.

DAUPHIN, G.; ZIENTARA, S. West Nile virus: Recent trends in diagnosis and vaccine development. **Vaccine** 2007, 25, 5563–5576.

DAVIS, H.L.; MICHEL, M.L.; WHALEN, R.G. DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody. **Hum. Mol. Genet.** 2 (1993) 1847-1851.

DE GRUIJL, T. D. *et al.* Intradermal delivery of adenoviral type-35 vectors leads to high efficiency transduction of mature, CD8⁺ T cell-stimulating skin-emigrated dendritic cells. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 177, n. 4, p. 2208–2215, 15 ago. 2006.

DE SILVA, N.S.; Klein, U. Dynamics of B cells in germinal centres. **Nat. Rev. Immunol.**, 15 (2015), pp. 137-148,

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 297–306, maio 2009.

DEMENTO, S. L. *et al.* Pathogen-associated molecular patterns on biomaterials: a paradigm for engineering new vaccines. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 294–306, jun. 2011.

DINIZ, M.; Ferreira, L. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Estudos Avançados**. 2010;24(70):19—30

DOMINGUES, C. M. A. S. *et al.* 46 anos do Programa Nacional de Imunizações: uma história repleta de conquistas e desafios a serem superados. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, n. suppl 2, 2020.

DONALDSON, B. *et al.* Virus-like particle vaccines: immunology and formulation for clinical translation. **Expert Review of Vaccines**, v. 17, n. 9, p. 833–849, 2 set. 2018.

EDMAN, J. C. *et al.* Synthesis of hepatitis B surface and core antigens in *E. coli*. 1981. **Biotechnology (Reading, Mass.)**, v. 24, p. 487–490, 1992.

ERASMUS, J. H.; FULLER, D. H. Preparing for Pandemics: RNA Vaccines at the Forefront. **Molecular Therapy**, v. 28, n. 7, p. 1559–1560, jul. 2020.

ERTL, H. C. Viral vectors as vaccine carriers. **Current Opinion in Virology**, v. 21, p. 1–8, dez. 2016.

ESPESETH, A. S. *et al.* Modified mRNA/lipid nanoparticle-based vaccines expressing respiratory syncytial virus F protein variants are immunogenic and protective in rodent models of RSV infection. **npj Vaccines**, v. 5, n. 1, 14 fev. 2020.

EUSÉBIO, D. *et al.* Methods to improve the immunogenicity of plasmid DNA vaccines. **Drug Discovery Today**, v. 26, n. 11, p. 2575–2592, nov. 2021.

EWER, K. J. *et al.* Viral vectors as vaccine platforms: from immunogenicity to impact. **Current Opinion in Immunology**, v. 41, p. 47–54, 1 ago. 2016.

EWERS, H. *et al.* Single-particle tracking of murine polyoma virus-like particles on live cells and artificial membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 42, p. 15110–15115, 18 out. 2005

FAUSCH, S. C.; DA SILVA, D. M.; KAST, W. M. Differential uptake and cross-presentation of human papillomavirus virus-like particles by dendritic cells and Langerhans cells. **Cancer Research**, v. 63, n. 13, p. 3478–3482, 1 jul. 2003.

FDA. Q&A for Comirnaty (COVID-19 Vaccine mRNA). **FDA**, 7 dez. 2021. Disponível em: <<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/qa-comirnaty-covid-19-vaccine-mrna/>>. Acesso em: 19 out. 2022

FERRO, E. S. Biotecnologia translacional: hemopressina e outros peptídeos intracelulares. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 109–121, 2010.

GARCIA, P. H. D. Sistemas de expressão de proteínas recombinantes – biofármacos. 2021. **Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.**

GAZETA, A. A. Brasil. Uma história do combate à varíola no Brasil: do controle à erradicação. 2006. 218 f. **Tese (Doutorado em História das Ciências e da Saúde) – Casa de Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.**

GEALL, A.J.; MANDL, C.W., ULMER, J.B. RNA: the new revolution in nucleic acid vaccines. **Semin Immunol.** 2013 Apr;25(2):152-9

GHAFFARIFAR, F. Plasmid DNA vaccines: where are we now? **Drugs of Today** (Barcelona, Spain: 1998), v. 54, n. 5, p. 315–333, 1 maio 2018.

GOMEZ, P. L.; ROBINSON, J. M. Vaccine Manufacturing. **Plotkin's Vaccines**, p. 51-60.e1, 2018.

GOSWAMI, R.; CHATZKLEANTHOS, D.; LOU, G.; GIUSTI, F.; BONCI, A.; TACCONI, M. *et al.* Mannosylation of LNP results in improved potency for self-amplifying RNA (SAM) vaccines. **ACS Infect Dis.** 2019;5:1546–58.

GUO, H.C; SUN, S.Q.; JIN, Y.; YANG, S.L.; WEI, Y.Q.; SUN, D.H.; YIN, S.H.; MA, J.W.; LIU, Z.X.; GUO, J.H.; LUO, J.X.; YIN, H.; LIU, X.T.; LIU, D.X. Foot-and-mouth disease virus-like particles produced by a SUMO fusion protein system in *Escherichia coli* induce potent protective immune responses in guinea pigs, swine and cattle. **Vet Res** 44:48. 2013

HAGENSEE, M. E.; YAEGASHI, N.; GALLOWAY, D. A. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. **Journal of Virology**, v. 67, n. 1, p. 315–322, 1993.

HANKE, T. New vector and vaccine platforms: mRNA, DNA, viral vectors. **Current opinion in HIV and AIDS**, v. 17, n. 6, p. 338–344, 1 nov. 2022.

HANSSON, M.; NYGREN, P.-Å.; STÅHL, S. Design and production of recombinant subunit vaccines. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 95, 1 out. 2000.

HARPER, D.M.; FRANCO, E.L.; WHEELER, C. *et al.* Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. **Lancet.** 2004; 364(9447): p.1757-1765.

HASSETT, K.J.; BENENATO, K.E.; JACQUINET, E. Optimization of lipid nanoparticles for intramuscular administration of mRNA vaccines. **Mol. Ther. Nucleic Acids** 2019, 15, 1–11.

HASSON, S.S.A.A.; HASSON, J.K.Z.; AL-BUSAIDI, T.A. Sallam. The past, current and future trends in DNA vaccine immunisations. **Asian Pac J Trop Biomed**, 5 (2015), pp. 344-353

HEESTERS, B.A.; VAN DER POEL, C.E.; DAS, A.; CARROLL, M.C. Antigen presentation to B cells. **Trends Immunol.**, 37 (2016), pp. 844-854, 10.1016/j.it.2016.10.003

HERZOG, C. Influence of parenteral administration routes and additional factors on vaccine safety and immunogenicity: a review of recent literature. **Expert Review of Vaccines**, v. 13, n. 3, p. 399–415, 10 fev. 2014.

HO, Y. *et al.* Assembly of human severe acute respiratory syndrome coronavirus-like particles. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 318, n. 4, p. 833–838, jun. 2004.

HOERR, I.; OBST, R.; RAMMENSEE, H.G.; JUNG, G. In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. **Eur. J. Immunol.** 2000, 30, 1–7.

HOMMA, A., *et al.* (org.). Vacinas e vacinação no Brasil: horizontes para os próximos 20 anos. Rio de Janeiro: **Edições Livres**, 2020. 250 p. E-book.

HUM **Vaccines Immunother**, 10 (2014), pp. 3153-3164

IAVARONE, C.; O'HAGAN, D.T.; YU, D.; DELAHAYE, N.F.; ULMER, J.B. Mechanism of action of mRNA-based vaccines. **Expert Rev. Vaccines** 2017, 16, 871–881.

JACKSON, D.A., SYMONS, R.H.; BERG, P., Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA molecules containing Lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia Coli. **Proc Nat Acad Sci USA**, 69: 2904-2909, 1972

JEGERLEHNER, A.; TISSOT, A.; LECHNER, F. *et al.* A molecular assembly system that renders antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell responses. **Vaccine**. 2002 Aug 19;20(25–26):3104–3112.

JEONG, H.; SEONG, B.L. Exploiting virus-like particles as innovative vaccines against emerging viral infections. **J Microbiol.** 2017;55(3):220–230

JOFFRE, O.; NOLTE, M.A.; SPORRI, R.; REIS E SOUSA, C. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. **Immunol. Rev.** 2009, 227, 234–247.

JORRITSMA, S. H. T. *et al.* Delivery methods to increase cellular uptake and immunogenicity of DNA vaccines. **Vaccine**, v. 34, n. 46, p. 5488–5494, nov. 2016.

JÚNIOR, J.; LIMA, K.; CASTELO, A.; MARTINS, V.; DOS SANTOS, S.; ACCIOLLI, L *et al.* É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculose? **J Bras Pneumol.** 2004;30(4):468—77

KALLEN, K.J.; HEIDENREICH, R.; SCHENEE, M.; PETSCH, B.; SCHLAKE, T.; THESS, A. *et al.* A novel, disruptive vaccination technology: self-adjuvanted RNActive® vaccines. **Hum Vaccin Immunother.** 2013;9(10):2263-76.

KANO, F. S.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C. Vacina de DNA: aspectos gerais e sua aplicação na medicina humana e veterinária. **Semina Ciências Agrárias**, v. 28, n. 4, p. 709–726, 2007.

KARIKÓ, K.; MURAMATSU, H.; LUDWIG, J.; WEISSMAN, D. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. **Nucleic Acids Res.** 39, e142 (2011).

KEATING, G.M.; NOBLE, S. Recombinant hepatitis B vaccine (Engerix-B (R)) - A review of its immunogenicity and protective efficacy against hepatitis B. **Drugs.** 2003; 63(10): p.1021-1051.

KENNEDY, S. B. *et al.* Phase 2 Placebo-Controlled Trial of Two Vaccines to Prevent Ebola in Liberia. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 15, p. 1438–1447, 12 out. 2017.

KHAN, F.A. The elements of immunology. Vaccines, Chapter 16 (p343-59). **Chennai Microprint**, India, 2009.

KIM, J.; EYGERIS, Y.; GUPTA, M.; SAHAY G. Self-assembled mRNA vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 170, p. 83–112, 1 mar. 2021.

KIRNBAUER, R. *et al.* Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 24, p. 12180–12184, 15 dez. 1992.

KOBIYAMA, K.; JOUNAI, N.; AOSHI, T.; TOZUKA, M.; TAKESHITA, F.; COBAN, C. *et al.* Innate immune signaling by, and genetic adjuvants for DNA vaccination. **Vaccines**, 1 (2013), pp. 278-292

LACHANCE, P.; DIONNE, M.; LIBMAN, M. *et al.* Immunogenicity of a quadrivalent virus-like particles (VLP) influenza vaccine in healthy adults. NCT02768805 **Medicago, Inc.** 2016.

LAZZARO, S. *et al.* CD8 T-cell priming upon mRNA vaccination is restricted to bone-marrow-derived antigen-presenting cells and may involve antigen transfer from myocytes. **Immunology**. 2015;146:312–326.

LECLERC, D.; BEAUSEIGLE, D.; DENIS, J. *et al.* Proteasome-Independent Major Histocompatibility Complex Class I Cross-Presentation Mediated by Papaya Mosaic Virus-Like Particles Leads to Expansion of Specific Human T Cells. **Journal of Virology**, v. 81, n. 3, p. 1319–1326, fev. 2007.

LEE, J. *et al.* Engineering DNA vaccines against infectious diseases. **Acta Biomaterialia**, v. 80, p. 31–47, 15 out. 2018.

LEE, L. Y. Y.; IZZARD, L.; HURT, A. C. A Review of DNA Vaccines Against Influenza. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 9 jul. 2018.

LEE, Y.N.; KIM, M.C.; LEE, Y.T.; HWANG, H.S.; CHO, M.K.; LEE, J.S.; KO, E.J.; KWON, Y.M.; KANG, S.M. AS04-adjuvanted virus-like particles containing multiple M2 extracellular domains of influenza virus confer improved protection. **Vaccine** 32(35):4578–4585. 2014

LI S.W.; ZHANG, J.; LI, Y.A. *et al.* A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. **Vaccine**. 2005; 23(22): p.2893-2901.

LI, J.-X. *et al.* Immunity duration of a recombinant adenovirus type-5 vector-based Ebola vaccine and a homologous prime-boost immunisation in healthy adults in China: final report of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 3, p. e324–e334, mar. 2017.

LI, L.; SAADE, F.; PETROVSKY, N. The future of human DNA vaccines. **Journal of biotechnology**, v. 162, n. 2-3, p. 171–182, 31 dez. 2012.

LI, M.; ZHAO, M.; FU, Y.; LI, Y.; GONG, T.; ZHANG, Z. *et al.* Enhanced intranasal delivery of mrna vaccine by overcoming the nasal epithelial barrier via intra- and paracellular pathways. **J Control Release**, 228 (2016), pp. 9-19

LIEBOWITZ, D. *et al.* Efficacy, immunogenicity, and safety of an oral influenza vaccine: a placebo-controlled and active-controlled phase 2 human challenge study. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 20, n. 4, p. 435–444, 1 abr. 2020.

LILJEQVIST, S.; STÅHL, S. Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. **Journal of Biotechnology**, v. 73, n. 1, p. 1–33, jul. 1999.

LINDSAY, K. E. *et al.* Visualization of early events in mRNA vaccine delivery in non-human primates via PET–CT and near-infrared imaging. **Nature Biomedical Engineering**, v. 3, n. 5, p. 371–380, 1 maio 2019.

LIU, M.A. (2003), DNA vaccines: a review. **Journal of Internal Medicine**, 253: 402-410.

LUA, L. H. L. *et al.* Bioengineering virus-like particles as vaccines. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 3, p. 425–440, 17 dez. 2013.

LUNDSTROM, K. Alphavirus-Based Vaccines. **Viruses**, v. 6, n. 6, p. 2392–2415, 16 jun. 2014.

LUNDSTROM, K. Viral Vectors for COVID-19 Vaccine Development. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 317, 19 fev. 2021.

MAI, Y.; GUO, J.; ZHAO, Y.; MA, S.; HOU, Y.; YANG, J. Intranasal delivery of cationic liposome-protamine complex mrna vaccine elicits effective anti-tumor immunity. **Cell Immunol**, 354 (2020), pp. 104-143

MANOLOVA, V. *et al.* Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 5, p. 1404–1413, maio 2008.

MARTINON, F.; KRISHNAN, S.; LENZEN, G.; MAGNE, R.; GOMARD, E.; GUILLET, J.G. *et al.* Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes *in vivo* by liposome-entrapped mRNA. **European Journal of Immunology** 1993;23(7):1719–22.

MARUGGI, G.; ZHANG, C.; LI, J.; ULMER, J.B.; YU, D. mRNA as a Transformative Technology for Vaccine Development to Control Infectious Diseases. **Mol Ther**, 27 (4) (2019), pp. 757-772

MCALEER, W. J. *et al.* Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature*, v. 307, n. 5947, p. 178–180, jan. 1984.

MCCANN, N. *et al.* Viral vector vaccines. **Current Opinion in Immunology**, v. 77, p. 102210, 1 ago. 2022.

MCINTOSH, J. D.; MANNING, K.; CHOKSHI, S. *et al.* An engineered non-toxic superantigen increases cross presentation of hepatitis B virus nucleocapsids by human dendritic cells. **PloS One**, v. 9, n. 4, p. e93598, 2014.

MCKEE, S. J.; BERGOT, A.-S.; LEGGATT, G. R. Recent progress in vaccination against human papillomavirus-mediated cervical cancer. **Reviews in Medical Virology**, v. 25, p. 54–71, mar. 2015.

MELO, A. C. DE S. Análise epidemiológica de felinos (*felis catus*) atendidos no Consultório de Prevenção de Enfermidades Infecciosas e Parasitárias de Cães e Gatos do Ispa/Ufra, Campus Belém. www.bdta.ufra.edu.br, 2019.

MORTOLA, E.; ROY, P. Efficient assembly and release of SARS coronavirus-like particles by a heterologous expression system. **FEBS Letters**, v. 576, n. 1-2, p. 174–178, 18 set. 2004.

MOSS, B.; SMITH, G.L.; GERIN, J.L.; PURCELL, R.H. Live recombinant vaccinia virus protects chimpanzees against hepatitis B. **Nature**, v. 311, n. 5981, p. 67–69, 1 set. 1984.

MÜHLEMANN, B. *et al.* Diverse variola virus (smallpox) strains were widespread in northern Europe in the Viking Age. **Science**, v. 369, n. 6502, p. eaaw8977, 23 jul. 2020.

MÜNZ, C. Antigen processing for MHC class II presentation via autophagy. **Front. Immunol.**, 3 (2012)

NETO, M.; MOREIRA, L. Uso de nanopartículas metálicas na vacinologia: implicações para o desenvolvimento de vacinas contra doenças infecciosas. **repositorio.bc.ufg.br**, 9 out. 2018.

NIGAR, S.; SHIMOSATO, T. Cooperation of oligodeoxynucleotides and synthetic molecules as enhanced immune modulators. **Front Nutr**, 6 (2019), p. 140

NOORAEI, S. *et al.* Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, 25 fev. 2021.

NUNES, A. R. A. Medicamentos Biológicos: Situação actual e perspectivas futuras. 85f. **Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas)** – Universidade Lusófona, Lisboa, Portugal, 2014.

NUTT, S. L.; TARLINTON, D. M. Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends? **Nature Immunology**, v. 12, n. 6, p. 472–477, 18 maio 2011.

OBERLI, M.A.; REICHMUTH, A.M.; DORKIN, J.R.; MITCHELL, M.J.; FENTON, O.S.; JAKLENEC, A.; ANDERSON, D.G.; LANGER, R.; BLANKSCHTEIN, D. Lipid nanoparticle assisted mRNA delivery for potent cancer immunotherapy. **Nano Lett**, 17 (2017), pp. 1326-1335

ORI, D.; MURASE, M.; KAWAI, T. Cytosolic nucleic acid sensors and innate immune regulation. **International Reviews of Immunology**, v. 36, n. 2, p. 74–88, 4 mar. 2017.

PARDI, N. *et al.* mRNA vaccines — a new era in vaccinology. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 4, p. 261–279, 12 jan. 2018.

PAREZ, N. *et al.* Rectal Immunization with Rotavirus Virus-Like Particles Induces Systemic and Mucosal Humoral Immune Responses and Protects Mice against Rotavirus Infection. **Journal of Virology**, v. 80, n. 4, p. 1752–1761, 15 fev. 2006.

PASCOLO, S. Vaccination with messenger RNA (mRNA). **Handbook of Experimental Pharmacology**, 183 (2008), pp. 221-235

PATEL, K. G.; SWARTZ, J. R. Surface Functionalization of Virus-Like Particles by Direct Conjugation Using Azide–Alkyne Click Chemistry. **Bioconjugate Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 376–387, 16 mar. 2011.

PERCHE, F.; CLEMENCON, R.; SCHULZE, K.; EBENSEN, T.; GUZMAN, C.A.; PICHON, C. Neutral lipopolyplexes for in vivo delivery of conventional and replicative RNA vaccine. **Mol Ther Nucleic Acids**. 2019;17:767–75.

PEREIRA, J. P. C.; BRAGA, G. M.; COSTA, G. A. NEGLIGÊNCIA À VACINAÇÃO: O RETORNO DO SARAMPO AO BRASIL. **e-Scientia**, v. 12, n. 1, p. 1–5, 24 ago. 2019.

PICKERING, B.M.; WILLIS, A. E. The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 16 (1) (2005), pp. 39-47

POLLET, J.; CHEN, W.-H.; STRYCH, U. Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 170, p. 71–82, mar. 2021.

PRITCHARD, E. *et al.* Impact of vaccination on new SARS-CoV-2 infections in the United Kingdom. **Nature Medicine**, v. 27, n. 8, p. 1370–1378, 1 ago. 2021.

PROBST, J.; WEIDE, B.; SCHEEL, B.; PICHLER, B.J.; HOERR, I.; RAMMENSEE, H.G. *et al.* Spontaneous cellular uptake of exogenous messenger RNA in vivo is nucleic acidspecific, saturable and ion dependent. **Gene Therapy** 2007;14(15):1175–80.

PRONKER, E. S. *et al.* Risk in Vaccine Research and Development Quantified. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e57755, 20 mar. 2013.

PULENDRAN, B.; AHMED, R. Immunological mechanisms of vaccination. **Nature Immunology**, v. 12, n. 6, p. 509–517, 18 maio 2011.

QIU, P.; ZIEGELHOFFER, P.; SUN, J.; YANG, N.S. Gene gun delivery of mRNA in situ results in efficient transgene expression and genetic immunization. **Gene Therapy** 1996;3(3):262–8.

QUEIROZ, A. M. V. *et al.* VLP-Based Vaccines as a Suitable Technology to Target Trypanosomatid Diseases. **Vaccines**, v. 9, n. 3, p. 220, 5 mar. 2021.

RADBRUCH, A.; MUEHLINGHAUS, G.; LUGER, E.O. *et al.* Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 10, p. 741–750, 1 out. 2006.

RAMQVIST, T.; ANDREASSON, K.; DALIANIS, T. Vaccination, immune and gene therapy based on virus-like particles against viral infections and cancer. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 7, n. 7, p. 997–1007, 1 jul. 2007.

REIS, C. *et al.* Biotecnologia para saúde humana: Tecnologias, Aplicações e Inserção na Indústria Farmacêutica. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 29, p. 359-392, mar. 2009.

RIBEIRO, O. M. F. B. O uso de nanopartículas de quitosano, revestidas com alginato como adjuvante do antígeno da hepatite B na vacinação através das mucosas oral e nasal. **[Dotourado]. Universidade de Coimbra; 2007**

RICHNER, J.M.; HIMANSU, S.; DOWD, K.A.; BUTLER S.L.; SALAZAR V.; FOX, J.M.; JULANDER J.G.; TANG, W. W.; SHRESTA, S.; PIERSON, T.C.; CIARAMELLA, G.; DIAMOND, M.S. Modified mRNA vaccines protect against zika virus infection. **Cell**, 168 (2017), pp. 1114-1125 e10

ROBERT-GUROFF, M. Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 546–556, dez. 2007.

RODRIGUES, E. Efficient induction of protective anti-malaria immunity by recombinant adenovirus. **Vaccine**, v. 16, n. 19, p. 1812–1817, nov. 1998.

ROOSE, K. *et al.* Hepatitis B core-based virus-like particles to present heterologous epitopes. **Expert Review of Vaccines**, v. 12, n. 2, p. 183–198, fev. 2013.

ROSA, S. S. *et al.* mRNA Vaccines manufacturing: Challenges and Bottlenecks. **Vaccine**, v. 39, n. 16, mar. 2021.

ROTELI-MARTINS, C. M.; TEIXEIRA, J. C. Vacinação compulsória: o limite entre o público e o privado. 2020. **Rev. Femina**. 48(12): 715-716, 20201231. ID: biblio-1141182

RUEDL, C.; STORNI, T.; LECHNER, F. *et al.* Cross-presentation of virus-like particles by skin-derived CD8(-) dendritic cells: a dispensable role for TAP. **European Journal of Immunology**, v. 32, n. 3, p. 818–825, 1 mar. 2002.

SAHIN, U.; KARIKÓ, K.; TÜRECI, Ö. mRNA-based therapeutics — developing a new class of drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 10, p. 759–780, 19 set. 2014.

SAMAL, K. C. *et al.* ZyCoV-D: World's First Needle-Free DNA Vaccine's Emergency Approval in India. **Biotica Research Today**, v. 3, n. 8, p. 714–716, 30 ago. 2021.

SAMARANAYAKE, L. P.; SENEVIRATNE, C. J.; FAKHRUDDIN, K. S. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) vaccines: A concise review. **Oral Diseases**, 31 maio 2021.

SANTOS, J. G. C. *et al.* TUBERCULOSE: ASPECTOS GERAIS E DESENVOLVIMENTO DE NOVAS VACINAS. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 82–92, 2020.

SASSO, E. *et al.* New viral vectors for infectious diseases and cancer. **Seminars in Immunology**, v. 50, p. 101430, 1 ago. 2020.

SCHNEERSON, R. *et al.* Quantitative and qualitative analyses of serum antibodies elicited in adults by Haemophilus influenzae type b and pneumococcus type 6A capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugates. **Infection and Immunity**, v. 52, n. 2, p. 519–528, 1986.

SCHUELER, P. Vacinas de Vetores Virais. **FIOCRUZ**. Disponível em: <<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/perguntas-frequentes/69-perguntas-frequentes/perguntas-frequentes-vacinas/2824-vacinas-de-vetores-virais-2>>. Acesso em: 17 out. 2022.

SHIRLEY, J. L. *et al.* Immune Responses to Viral Gene Therapy Vectors. **Molecular Therapy**, v. 28, n. 3, p. 709–722, mar. 2020

SILVA, C. S. P da. Da passagem à atenuação: Jenner e Pasteur e o desenvolvimento dos vírus inoculáveis. 2015. 110 f. **Tese (Doutorado em História da Ciência) - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo**, São Paulo, 2015.

SILVA, N. Análise do efeito adjuvante de nanopartículas de albumina sérica bovina na imunização de camundongos utilizando a proteína não estrutural 1 do Dengue vírus. **Unifal-mg.edu.br**, 2016.

SILVEIRA, M. M.; MOREIRA, G. M. S. G.; MENDONÇA, M. DNA vaccines against COVID-19: Perspectives and challenges. **Life Sciences**, p. 118919, dez. 2020.

SMEDLEY, T. BBC News Brasil. Como as vacinas de RNA que nos salvaram da covid-19 podem derrotar outras doenças. Brasil: **BBC**, 25 dez. 2021. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/geral-59776857>. Acesso em: 13 out. 2022.

SMITH, T. R. F. *et al.* Immunogenicity of a DNA vaccine candidate for COVID-19. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 20 maio 2020.

SOUSA *et al.* Movimento antivacinação: uma ameaça à humanidade. **Rev. e-ciência**, vol. 7, n. 2, pág. 41-42, 2019.

STRACHAN, M. W. J.; FRIER, B. M. History, Normal Physiology, and Production of Insulin. **Insulin Therapy**, p. 1–8, 2013

SU, C. *et al.* IFN- α as an Adjuvant for Adenovirus-Vectored FMDV Subunit Vaccine through Improving the Generation of T Follicular Helper Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66134, 18 jun. 2013.

TRAVIESO, T. *et al.* The use of viral vectors in vaccine development. **npj Vaccines**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 4 jul. 2022.

ULMER, J. B.; MASON, P.W.; GEALL, A.; MANDL, C.W. RNA-based vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. 30, p. 4414–4418, jun. 2012.

ULMER, J.; DONNELLY, J.; PARKER, S.; RHODES, G.; FELGNER, P.; DWARKI, V. *et al.* Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. **Science**. 1993;259(5102):1745--1749.

UNGARO, F.; CONTE, C.; QUAGLIA, F. *et al.* VLPs and particle strategies for cancer vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v. 12, n. 10, p. 1173–1193, out. 2013.

URA, T.; OKUDA, K.; SHIMADA, M. Developments in Viral Vector-Based Vaccines. **Vaccines**, v. 2, n. 3, p. 624–641, 29 jul. 2014.

Vaccines – COVID19 Vaccine Tracker. Disponível em: <https://covid19.trackvaccines.org/vaccines/approved/>. Acesso em: 20 out. 2022

VALENZUELA, P. *et al.* Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. **Nature**, v. 298, n. 5872, p. 347–350, 22 jul. 1982.

VERBEKE, R.; LENTACKER, I.; BRECKPOT, K.; JANSSENS, J.; VAN CALENBERGH, S.; DE SMEDT, S.C. *et al.* Broadening the message: a nanovaccine co-loaded with messenger rna and alpha-galcer induces antitumor immunity through conventional and natural killer t cells. **ACS Nano**, 13 (2) (2019), pp. 1655-1669

VICENTE, T. *et al.* Large-scale production and purification of VLP-based vaccines. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 107, p. S42–S48, jul. 2011.

VILLA, L.L.; COSTA, R.L.R.; PETTA, C.A. *et al.* Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. **Lancet Oncology**. 2005; 6(5): p.271-278.

WADHWA, A. *et al.* Opportunities and Challenges in the Delivery of mRNA-Based Vaccines. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 2, 28 jan. 2020.

WALSH, E. E. *et al.* Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 25, 14 out. 2020.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. **Nat Biotechnol**, 36, n. 12, p. 1136-1145, 12 2018.

WANG, T.; ZHANG, Z.; GAO, D. *et al.* Encapsulation of gold nanoparticles by simian virus 40 capsids. **Nanoscale**, v. 3, n. 10, p. 4275–4282, 5 out. 2011.

WHO. Background document on the Novavax (NVX-CoV2373) vaccine against COVID-19. 20 dez 2021. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/351165/WHO-2019-nCoV-vaccines-SAGE-recommendation-Novavax-NVX-CoV2373-background-2021.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 19 out. 2022.

WIN, S. J. *et al.* Cross-presentation of epitopes on virus-like particles via the MHC I receptor recycling pathway. **Immunology and Cell Biology**, v. 89, n. 6, p. 681–688, 1 ago. 2011.

WOLFF, J.; MALONE, R.; WILLIAMS, P.; Chong, W.; ACSADI, G.; JANI, A. *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science**. 1990;247(4949):1465--1468.

WOOLSEY, C.; GEISBERT, T. W. Current state of Ebola virus vaccines: A snapshot. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 12, p. e1010078, 9 dez. 2021.

WU, Z.; LI, T. Nanoparticle-Mediated Cytoplasmic Delivery of Messenger RNA Vaccines: Challenges and Future Perspectives. **Pharmaceutical Research**, 3 mar. 2021.

XU, F. *et al.* Safety, mucosal and systemic immunopotency of an aerosolized adenovirus-vectored vaccine against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. **Emerging Microbes & Infections**, v. 11, n. 1, p. 439–442, 29 jan. 2022.

XU, S. *et al.* mRNA Vaccine Era—Mechanisms, Drug Platform and Clinical Prospection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, p. 6582, 9 set. 2020.

YAMAMOTO, A.; KORMANN, M.; ROSENECKER, J.; RUDOLPH, C. Current prospects for mRNA gene delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 2009;71(3):484–9.

YAN, D. *et al.* The application of virus-like particles as vaccines and biological vehicles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 24, p. 10415–10432, 10 out. 2015.

YAN, D.; WEI, YQ.; GUO, H.C. *et al.* The application of virus-like particles as vaccines and biological vehicles. **Appl Microbiol Biotechnol** 99, 10415–10432 (2015).

YAN, M. *et al.* Despite differences between dendritic cells and Langerhans cells in the mechanism of papillomavirus-like particle antigen uptake, both cells cross-prime T cells. **Virology**, v. 324, n. 2, p. 297–310, jul. 2004.

YANG, B. *et al.* DNA vaccine for cancer immunotherapy. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 10, n. 11, p. 3153–3164, 2 nov. 2014.

YANG, Y.; BURKHARD, P. Encapsulation of gold nanoparticles into self-assembling protein nanoparticles. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 10, n. 1, p. 42, 2012.

YANKAUCKAS, M.A.; MORROW, J.E.; PARKER, S.E.; ABAI, A.; RHODES, G.H.; DWARKI, V.J.; GROMKOWSKI, S.H. Long-term anti-nucleoprotein cellular and humoral

immunity is induced by intramuscular injection of plasmid DNA containing NP gene. **DNA Cell. Biol.** 12 (1993) 771-776.

YE, T.; ZHONG, Z.; GARCÍA-SASTRE, A.; SCHOTSAERT, M.; DE GEEST, BG. Current status of COVID-19 (pre) clinical vaccine development. **Angew. Chem. Int.** 59(43), 18885–18897 (2020).

ZHONG, Z.; McCAFFERTY, S.; OPSOMER, L.; WANG, H.; HUYSMANS, H.; DE TEMMERMAN, J.; LIENENKLAUS, S.; PORTELA CATANI, J.P.; COMBES, F.; SANDERS, N.N. Corticosteroids and cellulose purification improve, respectively, the in vivo translation and vaccination efficacy of sa-mRNAs. **Mol. Ther.** 29, this issue, 1370–1381. (2021)

ZHU, F.-C. *et al.* Safety and immunogenicity of a novel recombinant adenovirus type-5 vector-based Ebola vaccine in healthy adults in China: preliminary report of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. **The Lancet**, v. 385, n. 9984, p. 2272–2279, jun. 2015.