

JOELMA RODRIGUES DE SOUZA
LÚCIO ROBERTO C CASTELLANO
MARCOS VINÍCIUS DA SILVA
Organizadores

O ESTADO DA ARTE NAS PESQUISAS EM VACINOLOGIA

Joelma Rodrigues de Souza
Lúcio Roberto Cançado Castellano
Marcos Vinícius da Silva
Organizadores

O Estado da Arte nas Pesquisas Em Vacinologia

ISBN: 0978-65-995536-3-9

DOI: 10.53924/vac1

1º Edição

Editora Creative

2021

2021

Copyright © dos autores e autoras. Todos os direitos reservados.

Todo conteúdo desta publicação (E-Book) é de total responsabilidade dos autores da obra. Estando a Editora Creative isenta de qualquer ação de responsabilidade no que tange plágio, direcionamento de opinião ou de afirmações de qualquer natureza.

Esta obra é publicada em acesso aberto. É permitido o download e seu compartilhamento, com a devida atribuição de crédito, sem que sejam feitas quaisquer alterações e sendo proibido sua utilização para fins comerciais.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CPI)
(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

O Estado da arte nas pesquisas em vacinologia
[livro eletrônico] / organização Joelma
Rodrigues de Souza , Lúcio Roberto C.
Castellano , Marcos Vinícius da Silva. --
João Pessoa, PB : Editora Creative, 2021.
PDF.

Bibliografia.
ISBN 978-65-995536-3-9

1. COVID-19 - Pandemia 2. Medicina 3. Pesquisa
científica 4. Vacinação 5. Vacinas I. Souza, Joelma
Rodrigues de. II. Castellano, Lúcio Roberto C.
III. Silva, Marcos Vinícius da.

21-94280

CDD-616.079
NLM-QW-806

Índices para catálogo sistemático:

1. Vacinação : Medicina 616.079

SUMÁRIO

PREFÁCIO	06
CAPÍTULO 01	07
VACINAS: AS PEDRAS FUNDAMENTAIS <i>Anna Victória Bernardes E Borges, Sara Brito Silva Costa Cruz, Juliana Reis Machado E Silva, Lúcio Roberto Caçado Castellano, Marcos Vinícius Da Silva.</i>	
CAPÍTULO 02	17
ABORDAGEM EM IMUNOINFORMÁTICA PARA CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS EM BUSCA DE VACINAS <i>Marcela Rezende Lemes, Andrei Giacchetto Felice, Eduarda Guimarães Sousa, Felipe Lucas Zen, Juliana Costa-Madeira, Ligia Carolina Da Silva Prado, Pedro Henrique Marques, Rafael Destro Rosa Tiveron, Thaís Cristina Vilela Rodrigues, Wylerson Guimarães Nogueira, Helioswilton Sales-Campos, Marcos Vinícius Da Silva; Vasco Ariston De Carvalho Azevedo, Siomar De Castro Soares, Sandeep Tiwari.</i>	
CAPÍTULO 03	41
VACINAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS: A NOVA ERA DA VACINOLOGIA MODERNA <i>Vanessa De Melo Cavalcanti Dantas, Pedro Henrique Lopes Ferreira Dantas, Andrei Félix Mendes, Waldecir Oliveira De Araújo Júnior, Brenda Fernandes, Lúcio Roberto Caçado Castellano, Clarice Neuschwander Lins De Moraes, Christian Robson De Souza Reis, Priscilla Anne Castro De Assis, Renato Antônio Dos Santos Oliveira, Joelma Rodrigues De Souza.</i>	
CAPÍTULO 04	59
VACINAS DE mRNA - A ESTRADA ATÉ AQUI <i>Anna Victória Bernardes E Borges, Emília De Freitas Beirigo, Thaís Soares Farnesi-De-Assunção, Carlo José Freire De Oliveira, Lúcio Roberto Caçado Castellano, Virmondes Rodrigues Jr, Marcos Vinícius Da Silva.</i>	
CAPÍTULO 05	77
VACINOLOGIA REVERSA E IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS VACINAIS POR BIOINFORMÁTICA <i>Andrei Giacchetto Felice, Arun Kumar Jaiswal, Felipe Lucas Zen, Ligia Carolina Da Silva Prado, Michele Min San Wu, Pedro Henrique Marques, Rafael Destro Rosa Tiveron, Rafael Obata Trevisan, Wylerson Guimarães Nogueira, Yngrid Victória Cassiano Mascarenhas, Carlo José Freire Oliveira, Vasco Ariston De Carvalho Azevedo, Siomar De Castro Soares.</i>	
CAPÍTULO 06	102
USO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS COMO VETORES DE ENTREGA DE VACINAS RECOMBINANTES <i>Monique Ferrary Américo, Andria Dos Santos Freitas, Tales Fernando Da Silva, Luís Lima De Jesus, Fernanda Alvarenga Lima, Rodrigo Dias De Oliveira Carvalho, Vasco Ariston De Carvalho Azevedo.</i>	
CAPÍTULO 07	121
VACINAS MULTIEPÍTOPO USANDO IMUNOINFORMÁTICA EM BACTÉRIAS, VÍRUS, PROTOZOÁRIOS E PARASITOS PATOGENICOS <i>Marcela Rezende Lemes, Andrei Giacchetto Felice, Eduarda Guimarães Sousa, Felipe Lucas Zen, Ligia Carolina Da Silva Prado, Pedro Henrique Marques, Rafael Destro Rosa Tiveron, Thaís Cristina Vilela Rodrigues, Wylerson Guimarães Nogueira, Marcos Vinícius Da Silva, Vasco Ariston De Carvalho Azevedo, Siomar De Castro Soares, Sandeep Tiwari.</i>	

CAPÍTULO 08	137
VACINOLOGIA REVERSA APLICADA A BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DE INTERESSE HUMANO E VETERINÁRIO	
<i>Andrei Giacchetto Felice, Arun Kumar Jaiswal, Felipe Lucas Zen, Ligia Carolina Da Silva Prado, Michele Min San Wu, Pedro Henrique Marques, Rafael Destro Rosa Tiveron, Rafael Obata Trevisan, Wylerson Guimarães Nogueira, Yngrid Victória Cassiano Mascarenhas, Carlo José Freire Oliveira, Vasco Ariston De Carvalho Azevedo, Siomar De Castro Soares.</i>	
CAPÍTULO 09	160
CANDIDATOS VACINAIS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA: BREVE ABORDAGEM SOBRE AS NOVAS PERSPECTIVAS	
<i>Priscilla Elias Ferreira Da Silva, Loren Queli Pereira, Helio Moraes-Souza.</i>	
CAPÍTULO 10	174
VACINOLOGIA REVERSA: UMA ALTERNATIVA PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL	
<i>Juliana Costa-Madeira, Maísa De Oliveira-Leandro, Marcela Rezende Lemes, Rafael Destro Rosa Tiveron, Marcos Vinicius Silva, Siomar De Castro Soares, Carlo José Freire Oliveira.</i>	
CAPÍTULO 11	192
EFICÁCIA DAS VACINAS FRENTE AS VARIANTES DE PREOCUPAÇÃO DA COVID-19	
<i>Eullália Gonçalo Das Neves E Silva, Talita Nunes Cardoso, Wedja Marcelino Da Silva, Anna Victória Bernardes E Borges, Joelma Rodrigues De Souza, Marcos Vinicius Da Silva, Lúcio Roberto Caçado Castellano.</i>	
CAPÍTULO 12	210
ANÁLISE DA COBERTURA VACINAL DO SARAMPO NO ESTADO DA PARAÍBA (2015-2020)	
<i>Ana Karla Maciel Soares, Deysiane De Oliveira Brandão, Vivianne Marcelino De Medeiros Candeia, Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva.</i>	
SOBRE OS ORGANIZADORES	223

PREFÁCIO

Temos a honra de apresentar à comunidade científica o livro “O Estado da Arte nas Pesquisas em Vacinologia (ISBN: 0978-65-995536-3-9)”. Esta obra é uma coleção de trabalhos técnico-científicos voltados à atualização dos leitores quanto aos avanços recentes obtidos na área de vacinologia.

Sabe-se que inúmeras doenças, sejam infecciosas ou crônico-degenerativas, atormentam a saúde de populações ao redor do mundo. Mesmo antes da atual pandemia de COVID-19, que demonstra grandiosidade sem precedentes, a comunidade científica vem buscando soluções para garantir vida saudável e longa para todos. Especialmente em momentos dinâmicos como o que vivemos nos últimos anos, avanços no desenvolvimento de vacinas mais seguras, eficazes e de fácil distribuição global se mostram imprescindíveis para gerar as bases do desenvolvimento humano. Evidentemente, devem ser levados em consideração aspectos éticos envolvidos no desenvolvimento, produção, testes pré-clínicos e clínicos, aprovação por órgãos regulatórios e distribuição de vacinas e insumos relacionados, além de pesquisas translacionais que utilizem ferramentas inovadoras para o desenvolvimento de novas plataformas vacinais. O uso de ferramentas *in silico* para o planejamento de candidatos vacinais, predição de epítomos e modelagens dinâmicas auxiliam na geração de novas plataformas capazes de gerar respostas imunes com elevado nível de reconhecimento de alvos específicos. Estes norteadores devem estar alinhados à uma ampla cobertura vacinal, capaz de promover a melhoria na qualidade de vida da população. Neste sentido, os doze capítulos selecionados para comporem esta obra abordam de maneira didática e de agradável leitura os avanços apresentados pela área de vacinologia nos últimos anos. Abordamos aqui desde o início da criação do conceito de vacinas, passando por discussões sobre a atual cobertura vacinal populacional em cenário de pandemia de COVID-19, até os novos métodos de desenvolvimento das vacinas e o uso de ferramentas de Inteligência Artificial nestes processos.

Esperamos, assim, que o livro possa contribuir como uma ferramenta de consulta às novas gerações interessadas no tema e que possa fornecer subsídios que reforcem o imprescindível papel das vacinas na saúde.

Joelma Rodrigues de Souza

Lúcio Roberto Cançado Castellano

Marcos Vinícius da Silva

Organizadores da Obra

CAPÍTULO 01

Vacinas: As Pedras Fundamentais

Anna Victória Bernardes e Borges¹
Sara Brito Silva Costa Cruz²
Juliana Reis Machado e Silva³
Lúcio Roberto Cançado Castellano⁴
Marcos Vinícius da Silva⁵

1 - Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Infectologia. Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

2 - Programa de Pós-graduação em Odontologia. Universidade Federal da Paraíba- UFPB

3 - Departamento de Patologia, Genética e Evolução. Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM

4 – Grupo de Estudos e Pesquisas em Imunologia Humana-GEPIH, Escola Técnica de Saúde da UFPB. Universidade Federal da Paraíba- UFPB

5 - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM

RESUMO

As vacinas são compostos baseados em antígenos ou que levam a sua produção e objetivam induzir o sistema imune a combater posteriores exposições a patógenos ou outras patologias, dando celeridade à resposta imune e prevenindo danos. Há milhares de anos a humanidade tenta formas de promover a imunidade no ser humano. Um exemplo é a técnica de variolização, onde Edward Jenner desenvolveu a vacina contra a varíola através da observação e inoculação de material de pústulas de humanos contendo a varíola bovina em pessoas saudáveis. Estes indivíduos, quando desafiados com o vírus da varíola humana não desenvolviam a doença. Baseado nesta experiência pioneira, as ideias sobre os mecanismos de ação e produção de vacinas, de forma intencional em laboratórios, foram aperfeiçoada com Louis Pasteur, ao descobrir que culturas de *Pasteurella multocida* atenuadas não causavam doenças ao serem inoculadas em galinhas e que estes animais ao serem posteriormente expostos às bactérias viáveis se tornavam resistentes à infecção. Este conceito de atenuação de microrganismos *in vitro* como estratégia imunização abriu caminho para o desenvolvimento de métodos mais seguros e eficazes, em um processo contínuo e alinhado com as necessidades e aprimoramentos tecnológicos. Apresentamos aqui um breve histórico dessa construção de conhecimento, que culminou com a experiência do rápido desenvolvimento das vacinas contra o SARS-CoV-2.

Palavras-chaves: Vacinas. Desenvolvimento. Variolização. História.

1. VACINAS

As vacinas são compostos complexos, que possuem diversas substâncias, tanto relacionadas com indução de respostas específicas aos agentes causadores de doenças, quanto direcionadoras de contextos de resposta imune desejáveis em cada condição. No sentido específico, antígenos de patógenos, por exemplo, induzem mecanismos imunes como a seleção e expansão de clones de linfócitos que irão reconhecer e combater a doença causada por esses microrganismos em posterior exposição. No sentido amplo, os adjuvantes ajudam a aumentar nossa resposta imunológica, através de contextos específicos de mecanismos imunes (D'AMELIO; SALEMI; D'AMELIO, 2016). Complementando as formulações, conservantes e estabilizadores garantem a permanência da eficácia da vacina e a protegem durante o armazenamento e transporte, respectivamente (WHO_a, 2021).

As vacinas reduzem os riscos de desenvolver uma doença após posterior infecção, induzindo o sistema imunológico para construir proteção. Esta tarefa consiste em fazer o sistema imunológico reconhecer o antígeno e iniciar a produção de anticorpos, células efectoras e de memória, através da ativação dos sistemas humoral e celular. Está ativação induzirá memória imunológica para o indivíduo vacinado e caso haja posterior contato com o mesmo agente etiológico em questão o sistema imunológico estará preparado e reconhecerá mais rapidamente o microrganismo através do antígeno, combatendo-o. Portanto, a vacina é uma forma segura e inteligente de produzir uma resposta imunológica no organismo, sem causar danos (KARCH; BURKHARD, 2016; ABBAS, 2019).

Atualmente existem vacinas disponíveis comercialmente para mais de 20 tipos de microrganismos patogênicos, como os causadores da COVID-19, Tétano, Poliomielite e Hepatite, e outras em desenvolvimento, como por exemplo com foco na Malária e HIV-1 (WHO_a, 2021).

2. PEDRAS FUNDAMENTAIS: DA ANTIVARIÓLICA AO CASO XVII

Há milhares de anos a humanidade tenta formas de promover a imunidade no ser humano, porém nem sempre essa busca foi através de vacinas típicas como conhecemos hoje mas sim usando a técnica de variolização, que consistia na retirada

de secreção das feridas de uma pessoa com varíola e na inoculação deste material em um indivíduo saudável. O desenvolvimento da vacinação, derivada desta experiência pioneira, nos levou a formas mais simples, seguras e eficazes de proteger os indivíduos contra patógenos, antes de entrar em contato com os mesmos. Ambas as técnicas induzem componentes do sistema imune para criar resistência às infecções específicas e tornar o sistema imunológico mais responsivo contra os microrganismos.

2.1. A variolização

A varíola é uma doença causada pelo vírus *Orthopoxvirus variolae*, mais conhecido por *smallpox*, cuja origem ainda é desconhecida. Somente no século XX estima-se que houve cerca de 300 a 500 milhões de mortos devido à enfermidade. Descrições clínicas em textos históricos e corpos mumificados indicam que a doença pode ter acometido o ser humano há mais de mil anos. Entre elas, populações chinesas (século IV), indianas (século VII), região mediterrânea (século X), assim como múmias egípcias, europeus (antes do século XV) e durante o colonialismo em terras americanas, africanas e australianas (THÈVES; BIAGINI; CRUBÉZY, 2014; MEYER; EHMANN; SMITH, 2020).

Na luta contra a varíola, existente há mais de mil anos, os povos orientais utilizavam o processo de variolização, que ocorria de diversas formas. Há relatos em que crianças eram levadas para passar uma temporada com pessoas que estavam acometidas pela forma leve varíola e até mesmo dormir em camas de outras crianças doentes. Na China, a técnica era realizada através da insuflação intranasal do pó das crostas de feridas purulentas. Na Índia, eram retiradas secreções dos eczemas das pessoas doentes e aplicadas em pessoas saudáveis, que adquiriam a doença mais branda do que através do contágio natural. No entanto, ainda assim, em diversas vezes a infecção se apresentava de forma sintomática deixando cicatrizes nos portadores. Antes do procedimento era necessária uma preparação de semanas, que consistia em sangria, uso de purgativos e dieta com restrição alimentar (FENNER, 1988; ARTENSTEIN, 2009).

O método da variolização estendeu-se pelos países orientais e ocidentais. No ocidente, a técnica difundiu-se prontamente na Grã-Bretanha com a ajuda de Mary

Wortley Montagu, aristocrata, escritora e poeta, que chamou a atenção da corte inglesa ao submeter seus filhos ao processo de variolização, que teria presenciado na Turquia (FENNER, 1988; UJVARI, 2003, ARTENSTEIN 2009).

2.2. A vacina de Edward Jenner

Em 1749 nascia em Berkeley, na Inglaterra, Edward Jenner, criador da vacina contra a varíola. Quando criança, Edward foi submetido à variolização, porém o que mais o impressionou foram os preparativos para a mesma. Ele passou pelo processo de sangria, de dieta hipocalórica e por processos purgativos. Decidido a estudar medicina, em Londres, nesse percurso conheceu o cirurgião e grande pesquisador John Hunter, com quem adquiriu o gosto pela investigação científica (FENNER, 1988).

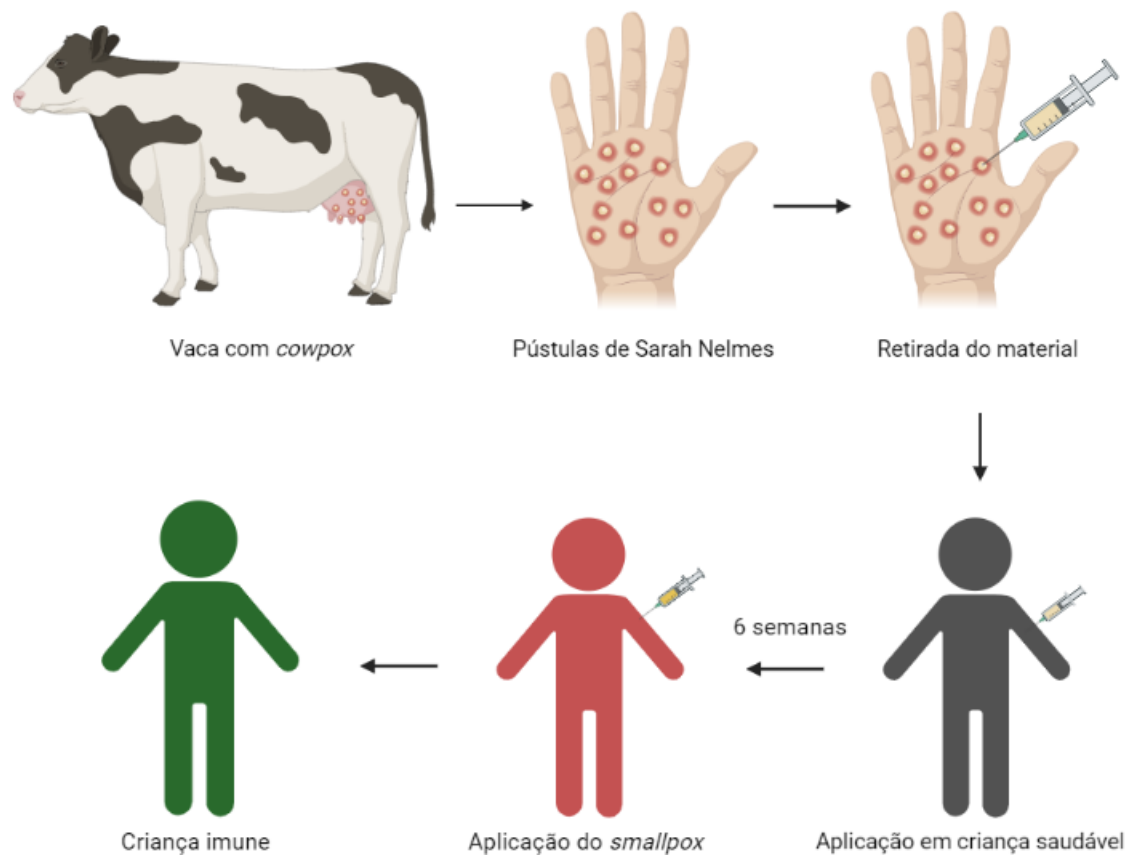
Na região da cidade de Berkeley, o gado era acometido com frequência de uma doença semelhante à varíola humana, conhecida por *cowpox*. As vacas afetadas apresentavam vesículas e pústulas nas mamas e as pessoas que as ordenhavam adquiriam a doença, manifestando lesões semelhantes nas mãos, que desapareciam espontaneamente. A população rural local observava que as pessoas que adquiriam a *cowpox* ficavam protegidas da *smallpox*, causadora da varíola humana (JENNER, 1802).

Ao voltar à Berkeley, Jenner observou, por 20 anos, 23 indivíduos que ao serem previamente contaminados pela doença bovina ficavam resistentes à varíola humana, desenvolvendo sintomas brandos ou até mesmo sendo assintomáticos. O mesmo comportamento era observado por outros médicos em outros países, com os quais Jenner trocava informações através de correspondências. Um dos casos mais citados é o 17º caso descrito (Figura 1), onde Jenner retirou o material das pústulas das mãos de Sarah Nelmes, uma mulher que adquiriu *cowpox* ao realizar ordenhas, e injetou no braço de um menino saudável de oito anos. Seis semanas depois, a criança foi submetida ao desafio com o vírus da varíola humana e não adquiriu a doença (JENNER, 1802).

Após suas observações Jenner fez sua primeira comunicação à Royal Society, de Londres, porém recebeu uma resposta negativa. Com isso, decidiu então publicar seus resultados por conta própria, em um pequeno livro intitulado “An

Inquiry into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae, a Disease Discovered in Some of the Western Counties of England, Particularly Gloucestershire and Known by the Name of Cowpox". Apesar da resistência, a vacinação antivariólica descoberta por Jenner difundiu-se por todo o mundo e em 1980, menos de duzentos anos após a descoberta da vacina, a Organização Mundial de Saúde declarava erradicada a varíola (WHO_b, 2021).

Figura 1 - Caso XVII



Legenda: Representação esquemática do Caso XVII. Sarah Nelmes contraiu a *cowpox* ao realizar a ordenha de uma vaca infectada. Jenner retirou o material das pústulas das mãos de Sarah e injetou no braço de um menino saudável de oito anos. Seis semanas depois, submeteu-o ao desafio com o *smallpox* e ele não adquiriu a doença. **Fonte:** Autoria própria, criado com BioRender.com

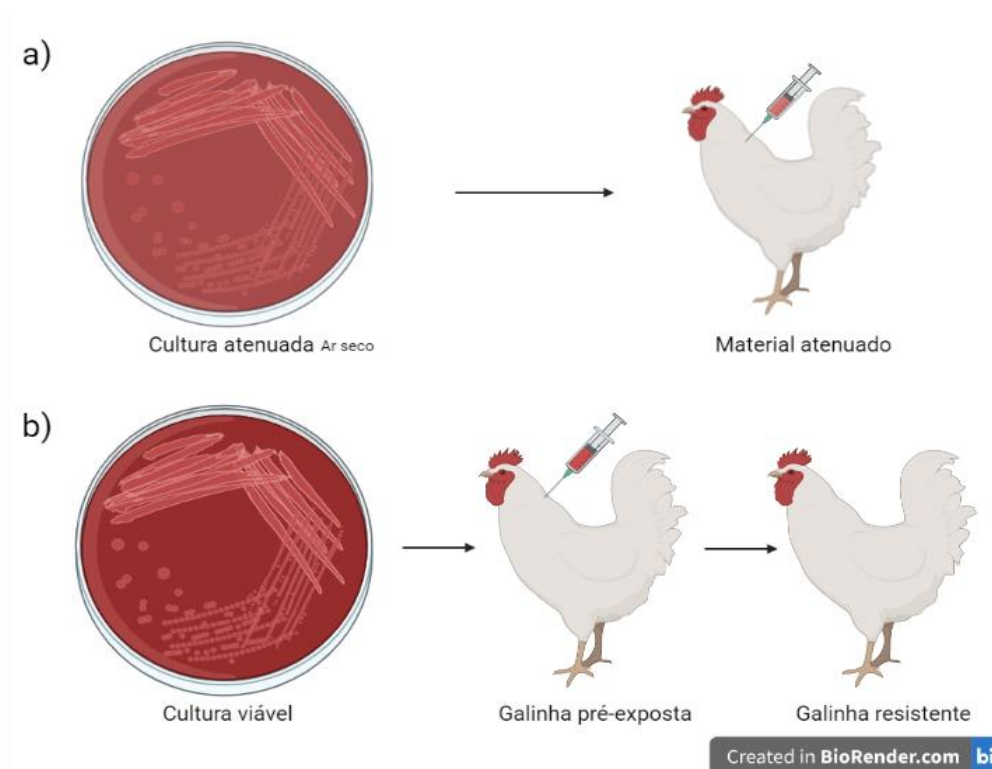
3. UMA IDEIA QUE SE TRANSFORMA NO LABORATÓRIO

As observações de Jenner e sua descoberta da vacina antivariólica abriram caminho para novas ideias sobre imunização, porém ele desconhecia a origem das infecções causadas por microrganismos patogênicos. A ideia sobre o mecanismo de ação e produção de vacinas, de forma intencional em laboratórios, veio após as

descobertas de Robert Koch e Louis Pasteur sobre as doenças infecciosas serem causadas por microrganismos (DE GREGORIO; RAPPUOLI, 2014).

Por volta de 1880, Pasteur descobriu o agente etiológico da cólera aviária, que hoje denominamos de *Pasteurella multocida*. Logo após, ele observou que as culturas bacterianas atenuadas por meios físicos ou químicos não causavam doenças ao serem inoculadas em galinhas, e que estes mesmos animais ao serem posteriormente expostos às bactérias viáveis eram resistentes, inferindo assim, que a cultura atenuada os tornava imunes (Figura 2) (BORDENAVE, 2003; PLOTKIN, 2005; PLOTKIN; PLOTKIN, 2011).

Figura 2 - Atenuação de patógenos



Legenda: Representação esquemática da atenuação de patógenos. Pasteur observou que as culturas bacterianas de *Pasteurella multocida* atenuadas, devido ao ar seco, quando aplicadas no modelo experimental não causavam doenças. Essas mesmas galinhas ao serem posteriormente expostas às bactérias viáveis eram resistentes, inferindo assim, que as culturas atenuadas as tornavam imunes.

Fonte: Autoria própria, criado com BioRender.com

Com os resultados promissores perante a cólera aviária, Pasteur queria soluções para situações humanas e então começou a testar suas hipóteses sobre o *Bacillus anthracis* e Vírus da raiva. Pasteur conseguiu prevenir a formação de esporo da bactéria *Bacillus anthracis* através da atenuação por altas temperaturas. A vacina

preparada foi testada em animais, que sobreviveram, enquanto os não vacinados adoeceram e morreram (TURNBULL, 1991). A primeira vacina contra o vírus da raiva, que foi cultivado na medula espinhal de um coelho e atenuada pela exposição ao ar seco, foi usada em 1885 para imunizar um menino de nove anos que havia sido mordido por um cão raivoso, obtendo sucesso (WU; SMITH; RUPPRECHT, 2011). Posteriormente, esta vacina pode ser usada de forma preventiva e como tratamento de pessoas já infectadas, devido ao longo período de incubação do vírus (PLOTKIN, 2005; PLOTKIN; PLOTKIN, 2011; DE GREGORIO; RAPPUOLI, 2014; HAJJ HUSSEIN *et al.*, 2015; D'AMELIO; SALEMI; D'AMELIO, 2016).

Nos anos subsequentes a esses achados, diversos cientistas utilizaram esses e outros meios de atenuação, como a passagem em embriões de galinha e camundongos, para desenvolver vacinas contra outros tipos de patógenos. Foi descoberto, então, que o desenvolvimento de uma vacina necessitava de isolamento, atenuação e injeção dos microrganismos ou toxinas causadoras de doenças. (Referência)

4. EVOLUÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DE VACINAS: DIFERENTES CONSTRUÇÕES SOB O MESMO ALICERCE

Após essas descobertas iniciais, a evolução na área das vacinas foi lenta, principalmente devido à dificuldade para cultivar os agentes infecciosos. Em meados do século XX, as técnicas de cultura de tecido foram elevadas ao nível de cultivar vírus. Foi quando se iniciaram os estudos para vacinas com microrganismos inativados, sendo mais seguras que as anteriores atenuadas. Nesse hall enquadrou-se o caso da vacina contra o vírus da poliomielite, desenvolvida pelo método de atenuação, por Albert Sabin um médico pesquisador do Instituto Rockefeller (EUA) e professor de pesquisas pediátricas da Universidade de Cincinnati, com grande interesse em pesquisas nas áreas de doenças infecciosas, principalmente à poliomielite. Houve também a vacina inativada, desenvolvida por Jonas Salk médico diretor do Laboratório de Pesquisa de Vírus da Escola de Medicina da Universidade de Pittsburgh e fundador do Instituto Salk de Estudos Biológicos (DE GREGORIO; RAPPUOLI, 2014; KARCH; BURKHARD, 2016; SALK, 2021; SABIN VACCINE INSTITUTE, 2021).

Através dos novos conhecimentos sobre o DNA, em 1970, surgiu a proposta de que estas moléculas poderiam ser modificadas. Alguns anos após, já tinham sido desenvolvidas técnicas para gerar DNA recombinante. Este DNA seria produzido para codificar antígenos que não conseguiam ser cultivados ou eram muito patogênicos. Maurice Hilleman, microbiologista e químico foi responsável pela criação de mais de 40 vacinas. Ele desenvolveu uma vacina, contra Hepatite B, purificando e inativando as partículas semelhantes a vírus (VLPs) que são encontradas em grandes quantidades no plasma de indivíduos cronicamente infectados (NEWMAN, 2005; DE GREGORIO; RAPPUOLI, 2014; KARCH; BURKHARD, 2016).

Inovações nas áreas de biologia molecular, engenharia genética e imunologia tornaram possível o desenvolvimento de vacinas sintéticas, dentre elas a produção de vacinas baseadas em ácidos nucleicos, como o mRNA. O primeiro relato do uso com sucesso de RNA e DNA transcrito *in vitro* em animais foi publicado em 1990, quando vetores de expressão de RNA e DNA contendo genes para cloranfenicol acetiltransferase, luciferase e β -galactosidase foram injetados separadamente no músculo esquelético de camundongo *in vivo* e as produções dessas proteínas foram detectadas (WOLFF *et al.*, 1990).

Outras metodologias envolvem a nanotecnologia, e trabalham com sistemas de entrega de antígenos. Porém não é um campo uniforme, mas sim uma mistura de muitos materiais em nanoescala diferentes que variam em sua composição química e comportamental. A diversidade no campo levou ao desenvolvimento de diferentes abordagens para nano vacinas, como o uso de nanopartículas sólidas de lipídeos para entregar antígenos de superfície do vírus da hepatite B ou então nano bastões de ouro sintetizados para transferir o DNA do plasmídeo do envelope viral do HIV-1 (KARCH; BURKHARD, 2016; HASANZADEH *et al.*, 2021).

5. CONCLUSÃO

Muitos séculos se passaram entre o conhecimento empírico sobre a vacinação, através da variolização, até o conhecimento científico que possuímos hoje. Vimos que, ao decorrer dos séculos houve, mesmo que lentos, avanços na compreensão do sistema imune, biologia molecular e engenharia genética, além do desenvolvimento

de práticas metodológicas. Fatores esses, que levaram os cientistas a descobertas sobre a criação de vacinas, que trabalham com o sistema imunológico para construir proteção através da indução de mecanismos imunes, como a seleção e expansão de clones de linfócitos induzindo memória imunológica, sendo uma forma segura de produzir uma resposta imunológica no organismo, sem causar doenças.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K. **Imunologia Celular e Molecular**. Grupo GEN, 2019. 9788595150355. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788595150355/>. Acesso em: 16 Nov 2021
- ARTENSTEIN, A. W. (Ed.). **Vaccines: a biography**. Springer Science & Business Media, 2009.
- BORDENAVE, G. Louis Pasteur (1822–1895). **Microbes and infection**, v. 5, n. 6, p. 553-560, 2003. DOI: 10.1016/s1286-4579(03)00075-3.
- D'AMELIO, E.; SALEMI, S.; D'AMELIO, R. Anti-infectious human vaccination in historical perspective. **International reviews of immunology**, v. 35, n. 3, p. 260-290, 2016. DOI: 10.3109/08830185.2015.1082177.
- DE GREGORIO, E.; RAPPUOLI, R. From empiricism to rational design: a personal perspective of the evolution of vaccine development. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 7, p. 505-514, 2014. DOI: 10.1038/nri3694.
- FENNER, F. et al. **Smallpox and its eradication**. World Health Organization. 1988.
- JENNER, E. An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae: a disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of the cow pox. **Springfield [Mass.]: Re-printed for Dr. Samuel Cooley, by Ashley & Brewer**, 1802.
- JONAS SALK. **Salk**. Disponível em: <https://www.salk.edu/about/history-of-salk/jonas-salk/>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- HAJJ HUSSEIN, I. et al. Vaccines through centuries: major cornerstones of global health. **Frontiers in public health**, v. 3, p. 269, 2015. DOI: 10.3389/fpubh.2015.00269
- HASANZADEH, A. et al. Nanotechnology against COVID-19: Immunization, diagnostic and therapeutic studies. **Journal of Controlled Release**, 2021. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.06.036
- KARCH, C. P.; BURKHARD, P. Vaccine technologies: from whole organisms to rationally designed protein assemblies. **Biochemical pharmacology**, v. 120, p. 1-14, 2016. DOI: 10.1016/j.bcp.2016.05.001.
- MEYER, H.; EHMANN, R.; SMITH, G. L. Smallpox in the post-eradication era. **Viruses**, v. 12, n. 2, p. 138, 2020. DOI: 10.3390/v12020138.
- NEWMAN, L. Maurice Hilleman. **BMJ**, v. 330, n. 7498, p. 1028, 2005.

PLOTKIN, S. A. Vaccines: past, present and future. **Nature medicine**, v. 11, n. 4, p. S5-S11, 2005. DOI: 10.1038/nm1209.

PLOTKIN, S. A.; PLOTKIN, S. L. The development of vaccines: how the past led to the future. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 889-893, 2011. DOI: 10.1038/nrmicro2668.

THE LEGACY OF ALBERT B. SABIN. **Sabin vaccine Intitute**. Disponível em: <https://www.sabin.org/legacy-albert-b-sabin>. Acesso em: 17 nov. 2021.

THÈVES, C.; BIAGINI, P.; CRUBÉZY, E. The rediscovery of smallpox. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 3, p. 210-218, 2014. DOI: 10.1111/1469-0691.12536.

TURNBULL, P. CB. Anthrax vaccines: past, present and future. **Vaccine**, v. 9, n. 8, p. 533-539, 1991. DOI: 10.1016/0264-410x(91)90237-z.

UJVARI, S. C. A história e suas epidemias: A convivência do homem com os microrganismos. Rio de Janeiro, Senac Rio; São Paulo, Senac São Paulo, 2003. 311p.

WHO_a. **Vaccines and immunization**. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/vaccines-and-immunization#tab=tab_1. Acesso em: 11 nov. 2021.

WHO_b. **Smallpox**. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/smallpox#tab=tab_1. Acesso em: 11 nov. 2021.

WOLFF, J. A. et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo, **Science** v.247, n. (4949 Pt 1), Mar, 1990. DOI: 10.1126/science.1690918.

WU, X.; SMITH, T. G.; RUPPRECHT, C. E. From brain passage to cell adaptation: the road of human rabies vaccine development. Expert review of vaccines, v. 10, n. 11, p. 1597-1608, 2011 DOI:10.1586/erv.11.140

CAPÍTULO 02

Abordagem Em Imunoinformática Para Caracterização E Identificação De Epítomos Em Busca De Vacinas

Marcela Rezende Lemes¹; Andrei Giacchetto Felice²;
Eduarda Guimarães Sousa³; Felipe Lucas Zen³; Juliana Costa-Madeira⁴;
Ligia Carolina da Silva Prado⁵; Pedro Henrique Marques³;
Rafael Destro Rosa Tiveron²; Thaís Cristina Vilela Rodrigues⁶;
Wylerson Guimarães Nogueira¹; Helioswilton Sales-Campos⁷;
Marcos Vinícius da Silva⁸; Vasco Ariston de Carvalho Azevedo⁹;
Siomar de Castro Soares⁸; Sandeep Tiwari.⁵

¹ *Doutoranda em Bioinformática. Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG*

² *Mestrando em Ciências, ênfase em Parasitologia e Imunologia Aplicadas. Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Infectologia - UFTM*

³ *Graduanda do curso de Biomedicina. Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM.*

⁴ *Doutoranda em Imunologia Básica e Aplicada. Programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada. Universidade de São Paulo - USP*

⁵ *Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.*

⁶ *Doutoranda no PPG em Genética, Depto de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG*

⁷ *Professor Adjunto do Departamento de Biociências e Tecnologia – Universidade Federal de Goiás*

⁸ *Professor Adjunto do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM.*

⁹ *Professor Titular do Departamento de Genética, Ecologia e Evolução - Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG*

RESUMO

A complexidade do sistema imune com interações com micro-organismos e intercelulares, produção de diversas citocinas e anticorpos faz com que para estudá-lo *in silico* sejam necessárias diversas abordagens computacionais diferentes. Estas podem ser agrupadas sob um mesmo termo: imunoinformática. A imunoinformática agrega um conjunto de técnicas estatísticas, computacionais, matemáticas e biológicas para estudar as funções imunológicas. As informações confirmadas experimentalmente são usadas para definir assinaturas estruturais e funcionais que serão a base para a criação e aplicação dessas ferramentas. Os softwares citados no capítulo facilitam e otimizam o tempo na confecção de vacinas e no desenvolvimento de novas formas de controle de doenças.

Palavras-chave: Imunoinformática. Bioinformática. Vacinologia. Epítomos. Vacinas.

1. INTRODUÇÃO

O sistema imune é organizado em diversos níveis, integrando moléculas, células, órgãos e organismos, com cada indivíduo possuindo um sistema único que responde de forma diferente a cada situação, objetivando manter a homeostasia e proteger de doenças. Seu estudo é, em grande parte, apoiado em modelos animais, *ex vivo*, *in vivo* ou *in vitro*, e modelos matemáticos, entretanto, devido aos grandes avanços tecnológicos, modelos computacionais (*in silico*) também tem ganhado força (LUNDEGAARD *et al.*, 2007).

A referência mais antiga sobre o sistema imunológico data de 430 ac, por Thucydides em Atenas, que notou que indivíduos que já haviam contraído uma determinada doença, se mantidos nutridos apresentavam uma certa resistência no acometimento dessa mesma doença em outras ocasiões (OWEN; PUNT; STRANFORD, 2013). Em 1798, ordenhadoras foram relatadas como sendo imunes a varíola, por terem contraído varíola bovina em outro estágio de suas vidas. Louis Pasteur apresentou o próximo grande avanço na área com a indução de imunidade ao cólera, após aplicar o patógeno enfraquecido em animais e, subsequentemente, em um garoto que havia sido atacado por um cachorro contaminado com o vírus da raiva, apesar de Pasteur não saber, na época, explicar como funcionava o mecanismo que acabara de explorar. Mais tarde, em 1890, experimentos realizados por Emil Von Behring e Shibasaburo Kitasato levaram ao entendimento do mecanismo imune, descrevendo em suas pesquisas que anticorpos presentes no soro conferiam proteção contra patógenos (OWEN; PUNT; STRANFORD, 2013).

Segundo o dogma da imunologia, possuímos tanto uma imunologia inata quanto uma adaptativa, sendo que a inata age como o centro de onde o sistema adaptativo foi capaz de se desenvolver. O sistema imune inato funciona como a primeira linha defensiva, contendo barreiras fisiológicas, fagocíticas e inflamatórias (KIMBRELL; BEUTLER, 2001). A resposta adaptativa é, em grande medida, moldada pela imunidade inata e tem a capacidade de que subsequente contato com um mesmo patógeno induza uma resposta mais rápida e eficiente, pelo sistema imune apresentar memória (OWEN; PUNT; STRANFORD, 2013).

O sistema adaptativo pode ser dividido em duas partes, a resposta celular, mediada por células T, e a resposta humoral, mediada por anticorpos derivados de células B (KORBER; LABUTE; YUSIM, 2006; OWEN; PUNT; STRANFORD, 2013). Proteínas e outras macromoléculas biológicas podem ser reconhecidas por receptores presentes em linfócitos T e B e anticorpos, sendo neste caso denominados de antígenos. Um antígeno possui uma região, conhecida como epítopo, a qual é especificamente reconhecida por estes receptores. Epítomos de células B podem ser lineares e descontínuos. Epítomos de células T são sempre peptídeos, via de regra menores que os reconhecidos por anticorpos e lineares. Os linfócitos T são divididos em duas grandes populações, dependendo da presença de uma ou outra glicoproteína em sua superfície, denominadas CD8 (Linfócitos T Citolíticos) ou CD4 (Linfócitos T auxiliares). Células T CD4 reconhecem peptídeos expostos por moléculas MHC de classe II e T CD8 reconhecem peptídeos expostos por moléculas MHC de classe I.

A grande complexidade do sistema imune leva também a geração enorme de dados relacionados a ele, pesquisas na área precisam lidar constantemente com essa complexidade, sendo necessário o desenvolvimento de novas metodologias computacionais para armazenar e analisar esses dados, surgindo então o campo da Imunoinformática, que se subdivide em diversos campos como imunogenômica, imunoproteômica, predição de epítomos e vacinologia *in silico*.

A imunoinformática inclui o estudo e desenvolvimento de algoritmos para o mapeamento de potenciais epítomos de células B e T, que podem também levar a exploração de potenciais locais de interação para o desenvolvimento de vacinas, metodologia, denominada vacinologia reversa (DAVIES; FLOWER, 2007).

Neste capítulo serão abordadas e descritas metodologias da imunologia clássica, diferentes bases de dados de imunoinformática e suas ferramentas e softwares de predição de células B e T, assim como as diversas aplicações atuais e para o futuro.

2. TIPOS DE VACINAS E SUAS LIMITAÇÕES

Para que uma vacina consiga induzir uma resposta imune eficaz e com segurança, conferindo proteção contra futuras infecções, ela deve conter antígenos derivados do patógeno alvo, ou sintetizados para representá-los. Normalmente este

componente primordial da vacina se trata de uma ou mais proteínas. No entanto, há vacinas construídas à base de polissacarídeos antigênicos, que também induzem respostas imunes protetoras. Este é o caso de diversas vacinas feitas no final da década de 1980, para prevenir infecções bacterianas como a pneumonia e meningite (por *Streptococcus pneumoniae*) (ROBBINS *et al.*, 1989).

Além disso, as vacinas podem ser classificadas em dois grupos principais: as vivas, e as não vivas (mais comumente denominadas inativadas), para distinguir as que possuem qualquer tipo de organismo replicante das que contém apenas componentes dos patógenos. Há também outros tipos de vacinas desenvolvidas nas últimas décadas, além das tradicionais, como a de vetores virais, e vacinas de RNA e de DNA, baseadas em ácidos nucleicos e que iremos abordar posteriormente.

2.1. Vacinas Vivas

As vacinas vivas exigem cuidados em sua administração, visto que os microrganismos, podem se replicar de forma descontrolada em indivíduos imunocomprometidos (por exemplo em pacientes HIV positivos), assim exigindo restrições em seu uso (RUBIN *et al.*, 2014). Dessa forma, estas vacinas são desenvolvidas considerando indivíduos imunocompetentes, onde os microrganismos irão se replicar o suficiente para gerar uma resposta imune, mas não a ponto de desencadear uma doença. Assim também, pode-se atenuar o microrganismo em uma vacina viva, o que, em ambos os casos irá requerer múltiplas doses, e de modo geral, induzem imunidade de vida curta para compensar a replicação do patógeno e evitar doenças sintomáticas como é o caso da vacina tifoide viva atenuada, Ty21a (MILLIGAN *et al.*, 2018).

2.2. Vacinas Não Vivas

Dentre as vacinas não vivas, um dos métodos mais simples e antigos, é o de células inteiras mortas, que basicamente inicia-se com a inativação dos patógenos por calor, química ou radiação. Essas vacinas não requerem refrigeração e podem ser liofilizadas para transporte. No entanto, produzem respostas imunológicas mais fracas, exigindo injeções de reforço adicionais para manter a imunidade. As toxóides, como o próprio nome indica, são produzidas pela inativação de toxinas bacterianas

com formalina, e são responsáveis por neutralizar as exotoxinas. Entretanto, nesta última, o indivíduo vacinado continuará contraindo a infecção e o patógeno ainda se desenvolverá, apenas suas toxinas são neutralizadas, enquanto a imunidade é criada naturalmente. Há ainda as vacinas conjugadas, que são a base de antígenos ou toxóides ligados a polissacarídeos do revestimento externo para estimular a imunidade (especialmente em bebês) (POLLARD; BIJKER, 2021).

Um outro tipo de vacina inativada, construída não com base em células mortas, mas sim a partir de proteínas (e mais especificamente de epítomos) dos patógenos, é a vacina de subunidades. Diferentemente das anteriores, essas vacinas usam apenas alguns antígenos específicos, o que reduz a probabilidade de reações adversas (CLEM, 2011). Mais precisamente, o conjunto de epítomos estimulam o sistema imunológico via MHC I e II; entretanto, essa especificidade aumenta a dificuldade de determinar quais antígenos devem ser incluídos na vacina. Esta desvantagem vem sendo vencida com o uso de novas tecnologias, como a imunoinformática, ampliando a predição de epítomos na construção de vacinas. É o caso de proteínas quiméricas altamente imunogênicas que podem ser construídas com base em epítomos previamente selecionados (TOSTA *et al.*, 2020).

Considerando que vacinas inativadas podem ser derivadas de células inteiras mortas, de proteínas purificadas do microrganismo, proteínas recombinantes ou polissacarídeos e ainda toxóides, situações onde não é ofertado o patógeno como um todo, é primordial para aumentar a imunogenicidade o acréscimo de adjuvantes (REED; ORR; FOX, 2013), substâncias que atuam como imunoestimuladores, induzindo uma apresentação de antígeno mais eficaz e estimulando a resposta imune inata.

2.3. Vacinas Não Tradicionais

Dentre as vacinas não tradicionais há as vacinas desenvolvidas à base de tecnologias de DNA recombinante ou RNA. Estas consistem na identificação de material genético codificante de antígeno (o alvo). Este material é captado por células, que passam a codificá-lo, expressando o antígeno, e induzindo respostas imunes humorais e celulares. Essas vacinas são altamente versáteis e rápidas, fáceis de serem

produzidas para patógenos emergentes (CORBETT *et al.*, 2020). Entre as desvantagens do uso dessas técnicas vacinais, existe a necessidade de administração direta nas células. Isso requer dispositivos de injeção altamente específicos (além de eletroporação ou uma molécula carreadora, o que traz o risco de imunogenicidade limitada) (WALLIS; SHENTON; CARLISLE, 2019).

Por fim, há as vacinas de vetores virais, introduzidas em 1972 por Jackson *et al.* (JACKSON *et al.*, 1972) que criaram um DNA recombinante a partir do vírus SV40. O que define as propriedades dessas vacinas, é o próprio vetor viral. Por exemplo, adenovírus são amplamente utilizados por induzirem uma resposta imune robusta, envolvendo linfócitos T citotóxicos contra antígenos estranhos expressos. Além disso, normalmente este tipo de vacina não requer adjuvantes e os componentes virais conseguem induzir respostas imunes inatas levando a produção de citocinas pró-inflamatórias (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Há alguns obstáculos a serem vencidos nesta técnica vacinal. Por exemplo, há o risco do vetor se integrar ao genoma do hospedeiro, podendo levar a um câncer, e, também há riscos do indivíduo já apresentar uma pré-imunidade contra o vetor e requererem alta segurança biológica em seu processo de produção (URA; OKUDA; SHIMADA, 2014).

Quadro 1: Exemplos de Vacinas e Seus Alvos

Tipo de Vacinas	Patógenos Alvos	Referências (DOI)
Vacinas Vivas/Atenuadas	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi	(MILLIGAN <i>et al.</i> , 2018)
Organismo morto	Influenza	(POEHLING <i>et al.</i> , 2018)
Toxóide	Difteria e Tétano	(LÉVY, 1975)
Subunidades	SARS-CoV-2	(RICHMOND <i>et al.</i> , 2021)
Vacinas de DNA	Zika vírus	(TEBAS <i>et al.</i> , 2021)
Vetor Viral	Ebola vírus	(ANGUIANO-ZARATE <i>et al.</i> , 2018)

Fonte: Elaborada pelos próprios autores

3. NOVAS TECNOLOGIAS E VACINAS BASEADAS EM PEPTÍDEOS (IMUNOINFORMÁTICA)

Nos últimos anos houve um enorme acúmulo de informações sobre imunologia, proteoma e genômica graças aos avanços de tecnologia científica, os quais têm sido continuamente depositados em diversos bancos de dados de acesso público. Porém, atualmente o desafio é descobrir como esse volume de novas informações coletadas junto à extensa literatura sobre a imunologia envolvida nas interações patógeno-hospedeiro, pode ser integrada em aplicações que tragam respostas mais rápidas e eficientes para problemas de saúde pública (NOGUEIRA, 2021; OLI *et al.*, 2020; SORIA-GUERRA *et al.*, 2015).

A bioinformática vem ocupando esse lugar de gerir e aplicar os dados gerados e armazenados nesses diversos bancos de dados existentes. Especificamente, a imunoinformática agrega um conjunto de técnicas estatísticas, computacionais, matemáticas e biológicas para estudar as funções imunológicas. Informações imunológicas que foram confirmadas experimentalmente são usadas para definir assinaturas estruturais e funcionais que serão a base para a criação e aplicação de ferramentas de predição (HEGDE *et al.*, 2017; TONG; REN, 2009).

Como consequência do avanço dessas tecnologias, o desenvolvimento de vacinas também foi acelerado, uma vez que é possível identificar e selecionar, baseado em todo conhecimento prévio de dados imunológicos, genômicos e proteômicos, as moléculas biológicas ou fragmentos de moléculas que poderiam desencadear respostas imunes humorais e/ou celulares (RAEVEN *et al.*, 2019). Enquanto a vacinologia clássica se baseia no uso de várias proteínas ou patógenos completos inativados ou atenuados, os quais possuem uma carga antigênica alta, que, inclusive, poderia aumentar as chances de induzir alergias ou outras reações adversas no hospedeiro, as novas vacinas preditas e desenvolvidas através da imunoinformática são capazes de desencadear respostas imunes altamente específicas e direcionadas (OLI *et al.*, 2020).

Um exemplo é a construção vacinas baseadas em peptídeos únicos ou múltiplos altamente antigênicos. Duas das primeiras vacinas de peptídeos foram desenvolvidas contra infecções causadas por *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli*

(JACOB *et al.*, 1985). Essas vacinas de peptídeos têm algumas vantagens sobre outras vacinas. Uma das principais vantagens é a rapidez e o custo baixo de produção, por se tratar de peptídeos curtos e por não necessitar de grande estrutura de cultivo de patógenos (PARVIZPOUR *et al.*, 2020). Uma vez que a estrutura do peptídeo é muito bem conhecida, as relações estrutura-função podem ser correlacionadas muito mais facilmente do que as vacinas convencionais. Além disso, a estrutura do peptídeo pode ser facilmente modificada para obter estruturas com vários epítomos ou conjugadas (multiepítomos), preparadas para a produção em larga escala (MOISA; KOLESANOVA, 2012). Tal fato é importante quando avaliamos patógenos que possuem ciclos de vida complexos ou altamente mutáveis, os quais não dependem de uma única via para sua virulência e, portanto, necessitam de um aumento da especificidade da vacina e não apenas a eficácia como visto nas vacinas convencionais atuais (OLI *et al.*, 2020).

Embora as vacinas de peptídeos limitem significativamente as complicações alergênicas ou reações indesejáveis, o baixo peso molecular e a eliminação fácil do corpo tornam os peptídeos menos imunogênicos, o que pode ser superado pelo uso de transportadores ou adjuvantes nas formulações dessas vacinas para aumentar sua imunogenicidade e diminuir a dose aplicada (MOISA; KOLESANOVA, 2012). Mais que isso, uma forma de contornar essas limitações são as vacinas multiepítomo, as quais são na verdade proteínas quiméricas que possuem um conjunto de epítomos obtidos a partir de alvos proteicos altamente antigênicos de um determinado patógeno associados ao uso de adjuvantes imunoestimulatórios e ligantes (*linkers*) (MALONIS; LAI; VERGNOLLE, 2019; PARVIZPOUR *et al.*, 2020). Essas vacinas contêm epítomos de peptídeos com 20-30 aminoácidos pré-selecionados que possuem alta imunogenicidade e que sejam capazes de ser reconhecidos e desencadear a resposta imune por meio da estimulação de células T citotóxicas ou células B, ou ambas simultaneamente (MOISA; KOLESANOVA, 2012).

Atualmente existem vários tipos de preditores de epítomos que são baseados em diferentes algoritmos computacionais desenhados para fornecer a maior probabilidade de ativação do sistema imune do hospedeiro (**Tabela 2**). Os preditores de epítomos de células T (ECTs) usam, em sua maioria, métodos indiretos (de predição de ligantes de MHC) pela sua alta precisão e especificidade. Existem métodos para os

dois grupos: os ligantes de MHC classe I (ECTs CD8 +, relacionados com o processamento do antígeno endógeno) e ligantes MHC classe II (ECTs auxiliares CD4 +, relacionado com o processamento exógeno de antígenos). No processamento endógeno, os antígenos são reconhecidos e clivados pelo proteassoma em fragmentos peptídicos menores, os quais são transportados para o retículo endoplasmático pela proteína transportadora associada ao processamento de antígeno (TAP) e, em seguida, são apresentados por moléculas de MHC de classe I a linfócitos T citotóxicos (CTLs). O método usado pelos preditores de ECTs geralmente usa a ligação ao complexo MHC I, o TAP, a eficiência de transporte e a predição de clivagem proteassomal como parâmetros de seleção de peptídeos. Para ligantes de MHC II, as ferramentas de imunoinformática disponíveis utilizam-se, em geral, de métodos de aprendizado de máquina (*Machine Learning*), como redes neurais artificiais (*Artificial Neural Networks*, ANNs), Máquina de vetores de suporte (*Support Vector Machines*, SVMs) e modelos ocultos de Markov (*Hidden Markov Models*, HMMs) (LARSEN *et al.*, 2007; PONOMARENKO *et al.*, 2008a; VITA *et al.*, 2019).

A ativação de células B de memória é baseada no reconhecimento e afinidade para dois tipos de epítomos de células B (ECB): epítomos contínuos (lineares) e descontínuos (conformacionais), sendo estes últimos cerca de 90% do total de ECBs. Por isso, os métodos mais utilizados na estimativa de ECBs são baseados em parâmetros como flexibilidade, hidrofobicidade, polaridade, detecção de superfícies expostas, propensão antigênica e acessibilidade de cadeias de peptídeos (PONOMARENKO *et al.*, 2008a). Dentre as ferramentas de imunoinformática desenvolvidas, o ABCPred foi o primeiro servidor para a previsão de epítomos de células B contínuos (SAHA; RAGHAVA, 2006) e o LBtope foi o primeiro servidor a usar ECB e não-ECBs verificados experimentalmente no banco de dados IEDB (SINGH; ANSARI; RAGHAVA, 2013a).

É conhecido que, tanto para ECB quanto ECT, nem todas as regiões de um antígeno de proteína são igualmente imunogênicas e questões de imunodominância devem ser levados em consideração (MALONIS; LAI; VERGNOLLE, 2019). Assim, esses fatores também podem ser controlados excluindo antígenos indesejados ou pouco eficientes, bem como regiões de homologia com o hospedeiro, que poderiam vir a causar autoimunidade, alergenicidade e toxicidade, diminuindo assim as chances

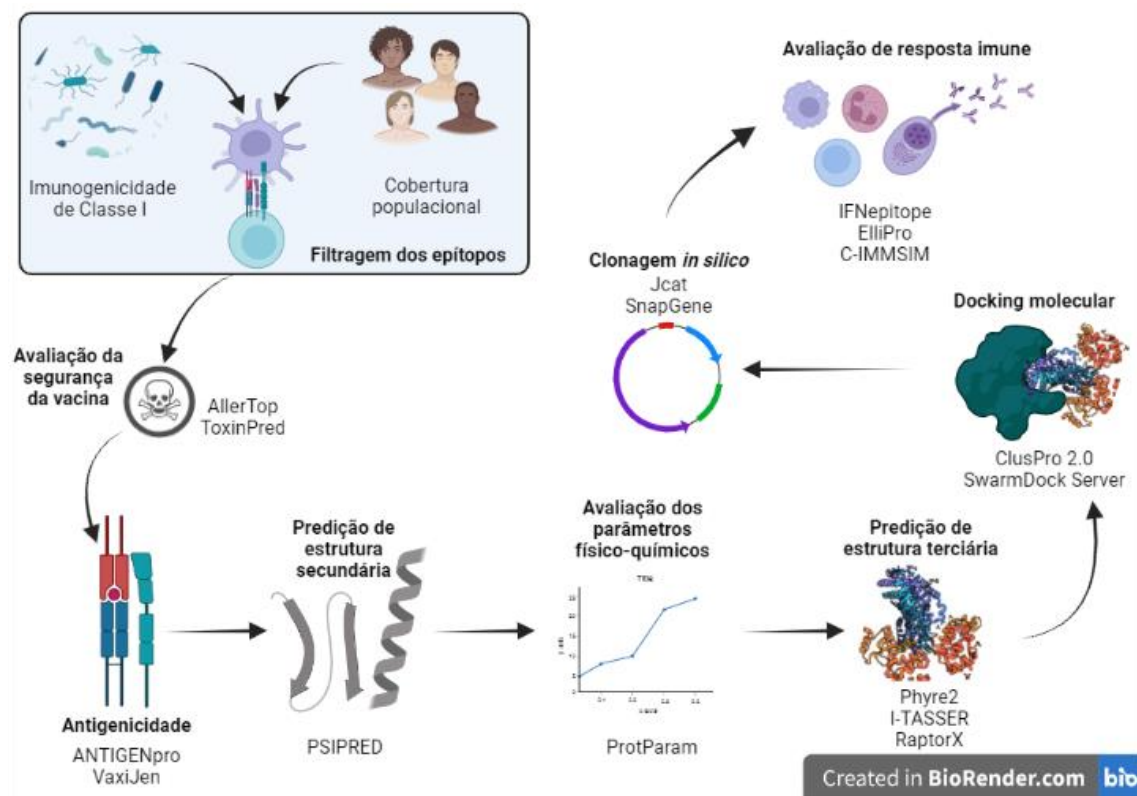
de efeitos adversos. Além disso, usando diversas ferramentas de imunoinformática disponíveis, é possível fazer previsões de propriedades físico-químicas e de solubilidade dessa vacina multiepitopo.

Analisando todas essas variáveis e após a seleção do melhor conjunto de epítomos disponível, as estruturas secundária e terciária podem ser preditas através de preditores computacionais para avaliar o modelo estrutural mais próximo da conformação nativa que aquela vacina teria. Dentre as ferramentas propostas para essas previsões de ligação, os métodos utilizados incluem a modelagem por homologia (*threading*), técnicas de docking molecular e identificação de motivos de ligação estrutural além de simulações de dinâmica molecular para analisar a estabilidade dessas interações (PARVIZPOUR *et al.*, 2020). Por fim, a última etapa é a avaliação da formulação da vacina *in vitro* e *in vivo* e a mesma deve ser desafiada contra o patógeno para revelar a eficiência da proteção antes dos estudos pré-clínicos e clínicos (TOPUZOĞULLARI *et al.*, 2020).

4. FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA DISPONÍVEIS

Com os avanços nas plataformas de sequenciamento, uma quantidade massiva de dados foi gerada. Com isso, se fez necessário o desenvolvimento de ferramentas capazes de examinar essas informações a fim de se obter respostas relevantes, inclusive para trabalhos relacionados ao desenvolvimento de vacinas (RAMANA; MEHLA, 2020). O **Quadro 2** mostra algumas das principais ferramentas *web-based* para predição de epítomos de MHC classe I, II e epítomos lineares de células B, já a **Figura 1** e a **Quadro 3**, fornecem algumas ferramentas utilizadas nas etapas mais importantes dos trabalhos de imunoinformática.

Figura 1 – Resumo das principais ferramentas de imunoinformática (detalhes no Quadro 3). Organograma da metodologia de imunoinformática com exemplos de softwares utilizados.



Fonte: Elaborada pelos próprios autores utilizando BioRender

Quadro 2: Ferramentas para predição de epítomos

Nome	Link	Categoria	Método aplicado na predição	Referência
IEDB Analysis Resource database	https://www.iedb.org/	Epítomos de células B, MHC I e MHC II	Redes Neurais Artificiais (ANR), Stabilized matrix method (SMM), Average relative binding (ARB), Sturniolo's method, consensus approach	(MARTINI <i>et al.</i> , 2020)

			and NetMHCpan.	
Rankpep	http://imed.med.ucm.es/Tools/rankpep.html	MHC I e MHC II	Position specific scoring matrices (PSSMs)	(RECHE <i>et al.</i> , 2004)
iVax (EpiVax)	http://www.epivax.com/	MHC I e MHC II	Conservatrix algorithm	(DE GROOT <i>et al.</i> , 2020)
NetMHCII - 2.3	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCII-2.3	MHC II	ANR	(JENSEN <i>et al.</i> , 2018)
NetCTL-1.2	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetCTL-1.2	MHC I	ANR e matriz de peso	(LARSEN <i>et al.</i> , 2007)
EpiJen	http://www.ddg-pharmfac.net/epijen/EpiJen/EpiJen.htm	MHC I	Algoritmo de várias etapas	(DOYTCHINOVA; GUAN; FLOWER, 2006)
SYFPEITHI	http://www.syfpeithi.de/bin/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm	MHC I e MHC II	Predição de motivos baseado em uma matriz de dados bidimensional	(RAMMEN SEE <i>et al.</i> , 1999)
MHCPrede	http://www.ddg-pharmfac.net/mhcpred/MHCPred/	MHC I e MHC II	Método Additive	(GUAN <i>et al.</i> , 2003)
BCpred	http://ailab-projects1.ist.psu.edu:8080/bcpred/predict.html	Epítotos de células B	Método FBCpred	(EL-MANZALAWY; DOBBS; HONAVAR, 2008)
BEPITOPE	http://bepitope.ibs.fr/	Epítotos de células B	Método de escala de propensão	(ODORICO; PELLEQUER, 2003)
BCEPREDE	https://webs.iiitd.edu.in/raghava/bcepred/	Epítotos de	Métodos de escala de propensão	(SAHA; RAGHAVA, 2004)

		células B		
ABCpred	https://webs.iiitd.edu.in/raghava/abcpred/ABC_method.html	Epítomos de células B	ANR	(SAHA; RAGHAVA, 2006)
BepiPred 2.0	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?BepiPred-2.0	Epítomos de células B	Algoritmo <i>Random forest</i>	(GALGONE K <i>et al.</i> , 2017)
Epitopia	http://epitopia.tau.ac.il/index.html	Epítomos de células B	Aprendizado de máquina (AM)	(RUBINSTEIN <i>et al.</i> , 2009)
COBEpro	http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/	Epítomos de células B	Máquina de vetores de suporte (SVM)	(SWEREDO SKI; BALDI, 2009)
SVMTriP	http://sysbio.unl.edu/SVMTriP/index.php	Epítomos de células B	MVS combinado com Semelhança tripeptídica (TriP) e pontuações de propensão	(YAO <i>et al.</i> , 2012)
LBtope	https://webs.iiitd.edu.in/raghava/lbtope/help.php	Epítomos de células B	SVM e algoritmo de escalas de propensão	(SINGH; ANSARI; RAGHAVA, 2013b)
iBCE-EL	http://thegleelab.org/iBCE-EL/	Epítomos de células B	Estrutura de aprendizagem em combinada com classificadores <i>extremely randomized tree</i> (ERT) e de aumento de gradiente (GB).	(MANAVAN LAN <i>et al.</i> , 2018)

Quadro 3: Outras ferramentas relevantes de imunoinformática baseadas na Figura 1

Etapa	Nome	Link	Métodos aplicados na predição	Referência
Filtragem dos epítomos	Imunogenicidade de Classe I	http://tools.iedb.org/immunogenicity/	Enriquecimento de aminoácidos em peptídeos imunogênicos versus não imunogênicos	(CALIS <i>et al.</i> , 2013)
	Cobertura Populacional	http://tools.iedb.org/population/	Programa de análise de algoritmo de computador personalizado	(BUI <i>et al.</i> , 2006)
Avaliação da segurança da vacina	AllerTop	https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/method.html	Auto covariância cruzada (ACC) e AM	(DIMITROV <i>et al.</i> , 2014)
	ToxinPred	https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred/algo.php	SVM e matrizes quantitativas	(GUPTA <i>et al.</i> , 2013)
Antigenicidade	ANTIGENpro	http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/	SVM	(MAGNAN <i>et al.</i> , 2010)
	VaxiJen	http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html	ACC	(DOYTCHINOVA; FLOWER, 2007)
Predição de estrutura secundária	PSIPRED	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/	AM, ANR	(BUCHAN; JONES, 2019)

Avaliação dos parâmetros físico-químicos	ProtParam	https://web.expasy.org/protparam/	Calcula os índices utilizando a sequência de aminoácidos da proteína e diversas fórmulas	(WALKER, 2005)
Predição de estrutura terciária	Phyre2	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index	Modelagem de múltiplos modelos e simulação simplificada de dobramento <i>ab initio</i>	(KELLEY <i>et al.</i> , 2015)
	I-TASSER	https://zhanggroup.org/I-TASSER/	Montagem de fragmento baseado em modelo iterativo - Threading	(ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010)
	RaptorX	http://raptorx.uchicago.edu/	Threading de múltiplos modelos	(KÄLLBERG <i>et al.</i> , 2012)
Docking molecular	ClusPro 2.0	https://cluspro.bu.edu/login.php	Algoritmo PIPER docking e <i>pairwise</i> IRMSD	(KOZAKOV <i>et al.</i> , 2017)
	SwarmDock Server	https://bmm.crick.ac.uk/~svc-bmm-swarmdock	Algoritmo híbrido com otimização por enxame de partículas e busca local	(TORCHAL A <i>et al.</i> , 2013)

Clonagem <i>in silico</i>	Jcat	http://www.jcat.de/	Algoritmo de Carbone	(GROTE <i>et al.</i> , 2005)
	SnapGene	snapgene.com	Programa de visualização	SnapGene software (from Insightful Science; available at snapgene.com)
Avaliação de resposta imune	IFNepitope	https://webs.iiitd.edu.in/raghava/ifnepitope/developer.php	Abordagem híbrida de Motif e SVM	(DHANDA; VIR; RAGHAVA, 2013)
	ElliPro	http://tools.iedb.org/ellipro/	Método de Thornton com algoritmo MODELLER	(PONOMARENKO <i>et al.</i> , 2008b)
	C-IMMSIM	https://kraken.iac.rm.cnr.it/C-IMMSIM/	Métodos de predição de epítomos juntamente com medições do potencial proteína-proteína de Miyazawa e Jernigan	(RAPIN <i>et al.</i> , 2010)

Fonte: Elaborada pelos próprios autores.

5. CONCLUSÃO

A Imunoinformática compreende inúmeras ferramentas de bioinformática que facilitam e otimizam o tempo na confecção de vacinas e no desenvolvimento de novas formas de controle de doenças. Várias aplicações são vistas no uso dessas ferramentas, as quais compreendem várias informações sobre imunologia, proteômica e genômica

desenvolvidas ao longo dos anos e as quais hoje são de fácil acesso por estarem depositadas em diversos bancos de dados de acesso público. Diante disso, a imunoinformática vai utilizar várias técnicas matemáticas, informáticas e estatísticas para poder identificar moléculas e fragmentos biológicos que podem ser considerados alvos vacinais, dispondo de um menor custo na confecção, maior agilidade e especificidade para gerar uma resposta imune no hospedeiro e assim controlar uma possível infecção.

Diferentemente das metodologias convencionais na confecção de vacinas que demanda maior tempo e que podem até gerar uma reação adversa no hospedeiro, como vacinas atenuadas para as quais deve haver uma certa cautela na aplicação destas em indivíduos imunocomprometidos, uma vez que há possibilidade do microrganismo se replicar de forma descontrolada. Então, de certa maneira, há certas restrições dependendo do tipo de vacina e sua composição no momento de gerar uma resposta imune no hospedeiro, por isso o uso de tecnologias de imunoinformática são tão necessárias e úteis para o desenvolvimento de vacinas, como as de subunidades as quais possibilitaram o uso de epítomos previamente selecionados, facilitando no momento da determinação a identificação de quais antígenos podem ser usados e que são imunogênicos o suficiente.

Para a confecção de uma vacina que tenha uma alta eficiência de gerar uma resposta imune, vários preditores de epítomos baseados em algoritmos computacionais podem ser usados. Parâmetros como ligação ao complexo MHC I, TAP, atividade proteossomal são usados como preditores de ECTs na seleção de peptídeos. Outros parâmetros podem ser usados quando se trata de ligantes ao MHC II na utilização de métodos de machine learning, como ANNs, SVMs e modelos de Markov ocultos (HMMs), e da mesma maneira na estimativa de ECBs no uso de ferramentas de Imunoinformática como ABCPred e o LBtope. Além disso, outros parâmetros para a análise da imunodinâmica podem ser realizados também através de preditores computacionais.

Atualmente muitos estudos são e já foram realizados a fim de erradicar e diminuir diversas patogenias. A Imunoinformática consegue propor uma certa perspectiva no controle de doenças, visto que são essenciais no combate de infecções emergentes pois possibilita selecionar possíveis alvos vacinais e de drogas. Assim,

pode ser visto uma grande contribuição da bioinformática e Imunoinformática na saúde pública contribuindo diretamente para o bem-estar da população.

REFERÊNCIAS

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, vol. 124, no. 4, p. 783–801, 24 Feb. 2006. DOI 10.1016/J.CELL.2006.02.015. Available at: <http://www.cell.com/article/S0092867406001905/fulltext>. Accessed on: 15 Nov. 2021.

ANGUIANO-ZARATE, S. S.; MATCHETT, W. E.; NEHETE, P. N.; SASTRY, J. K.; MARZI, A.; BARRY, M. A. A Replicating Single-Cycle Adenovirus Vaccine Against Ebola Virus. *The Journal of infectious diseases*, vol. 218, no. 12, p. 1883–1889, 5 Nov. 2018. DOI 10.1093/INFDIS/JIY411. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29982595/>. Accessed on: 16 Nov. 2021.

BUCHAN, D. W. A.; JONES, D. T. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic acids research*, vol. 47, no. W1, p. W402–W407, 1 Jul. 2019. DOI 10.1093/NAR/GKZ297. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31251384/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

BUI, H. H.; SIDNEY, J.; DINH, K.; SOUTHWOOD, S.; NEWMAN, M. J.; SETTE, A. Predicting population coverage of T-cell epitope-based diagnostics and vaccines. *BMC bioinformatics*, vol. 7, 17 Mar. 2006. DOI 10.1186/1471-2105-7-153. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16545123/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

CALIS, J. J. A.; MAYBENO, M.; GREENBAUM, J. A.; WEISKOPF, D.; DE SILVA, A. D.; SETTE, A.; KEŞMİR, C.; PETERS, B. Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity. *PLoS computational biology*, vol. 9, no. 10, Oct. 2013. DOI 10.1371/JOURNAL.PCBI.1003266. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24204222/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

CLEM, A. S. Fundamentals of vaccine immunology. *Journal of Global Infectious Diseases*, vol. 3, no. 1, p. 73, Jan. 2011. DOI 10.4103/0974-777X.77299. Accessed on: 15 Nov. 2021.

CORBETT, K. S.; EDWARDS, D. K.; LEIST, S. R.; ABIONA, O. M.; BOYOGLU-BARNUM, S.; GILLESPIE, R. A.; HIMANSU, S.; SCHÄFER, A.; ZIWAWO, C. T.; DIPIAZZA, A. T.; DINNON, K. H.; ELBASHIR, S. M.; SHAW, C. A.; WOODS, A.; FRITCH, E. J.; MARTINEZ, D. R.; BOCK, K. W.; MINAI, M.; NAGATA, B. M.; ... GRAHAM, B. S. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature* 2020 586:7830, vol. 586, no. 7830, p. 567–571, 5 Aug. 2020. DOI 10.1038/s41586-020-2622-0. Available at: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2622-0>. Accessed on: 15 Nov. 2021.

DAVIES, M. N.; FLOWER, D. R. Harnessing bioinformatics to discover new vaccines. *Drug discovery today*, vol. 12, no. 9–10, p. 389–395, May 2007. DOI 10.1016/J.DRUDIS.2007.03.010. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17467575/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

DE GROOT, A. S.; MOISE, L.; TERRY, F.; GUTIERREZ, A. H.; HINDOCHA, P.; RICHARD, G.; HOFT, D. F.; ROSS, T. M.; NOE, A. R.; TAKAHASHI, Y.; KOTRAIAH, V.; SILK, S. E.; NIELSEN, C. M.; MINASSIAN, A. M.; ASHFIELD, R.; ARDITO, M.; DRAPER, S. J.; MARTIN, W. D. Better Epitope Discovery, Precision Immune Engineering, and Accelerated Vaccine Design Using Immunoinformatics Tools. *Frontiers in immunology*, vol. 11, 7 Apr. 2020. DOI 10.3389/FIMMU.2020.00442.

DHANDA, S. K.; VIR, P.; RAGHAVA, G. P. S. Designing of interferon-gamma inducing MHC class-II binders. **Biology direct**, vol. 8, no. 1, 5 Dec. 2013. DOI 10.1186/1745-6150-8-30. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24304645/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

DIMITROV, I.; BANGOV, I.; FLOWER, D. R.; DOYTCHINOVA, I. AllerTOP v.2--a server for in silico prediction of allergens. **Journal of molecular modeling**, vol. 20, no. 6, 2014. DOI 10.1007/S00894-014-2278-5. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24878803/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. **BMC bioinformatics**, vol. 8, 5 Jan. 2007. DOI 10.1186/1471-2105-8-4. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17207271/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

DOYTCHINOVA, I. A.; GUAN, P.; FLOWER, D. R. EpiJen: a server for multistep T cell epitope prediction. **BMC bioinformatics**, vol. 7, 13 Mar. 2006. DOI 10.1186/1471-2105-7-131. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16533401/>. Accessed on: 16 Nov. 2021.

EL-MANZALAWY, Y.; DOBBS, D.; HONAVAR, V. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. **Journal of molecular recognition : JMR**, vol. 21, no. 4, p. 243–255, Jul. 2008. DOI 10.1002/JMR.893. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18496882/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

GALGONEK, J.; VYMĚTAL, J.; JAKUBEC, D.; VONDRÁŠEK, J. Amino Acid Interaction (INTAA) web server. **Nucleic acids research**, vol. 45, no. W1, p. W388–W392, 3 Jul. 2017. DOI 10.1093/NAR/GKX352. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28472475/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

GROTE, A.; HILLER, K.; SCHEER, M.; MÜNCH, R.; NÖRTEMANN, B.; HEMPEL, D. C.; JAHN, D. JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. **Nucleic acids research**, vol. 33, no. Web Server issue, Jul. 2005. DOI 10.1093/NAR/GKI376. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15980527/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

GUAN, P.; DOYTCHINOVA, I. A.; ZYGOURI, C.; FLOWER, D. R. MHCpred: A server for quantitative prediction of peptide-MHC binding. **Nucleic acids research**, vol. 31, no. 13, p. 3621–3624, 1 Jul. 2003. DOI 10.1093/NAR/GKG510. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12824380/>. Accessed on: 16 Nov. 2021.

GUPTA, S.; KAPOOR, P.; CHAUDHARY, K.; GAUTAM, A.; KUMAR, R.; RAGHAVA, G. P. S. In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins. **PloS one**, vol. 8, no. 9, 13 Sep. 2013. DOI 10.1371/JOURNAL.PONE.0073957. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24058508/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

HEGDE, N. R.; GAUTHAMI, S.; SAMPATH KUMAR, H. M.; BAYRY, J. The use of databases, data mining and immunoinformatics in vaccinology: where are we? **<https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1413088>**, vol. 13, no. 2, p. 117–130, 1 Feb. 2017. DOI 10.1080/17460441.2018.1413088.

JACKSON, D. A.; SYMONST, R. H.; BERG -, P.; LOBBAN, D. P.; KAISER, A. D. 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 69, no. 10, p. 2904–2909, 1 Oct. 1972. DOI 10.1073/PNAS.69.10.2904. Available at: <https://www.pnas.org/content/69/10/2904>. Accessed on: 15 Nov. 2021.

JACOB, C. O.; LEITNER, M.; ZAMIR, A.; SALOMON, D.; ARNON, R. Priming immunization against cholera toxin and E. coli heat-labile toxin by a cholera toxin short peptide-beta-galactosidase hybrid synthesized in E. coli. **The EMBO Journal**, vol. 4, no. 12, p. 3339–3343, 1 Dec. 1985. DOI 10.1002/J.1460-2075.1985.TB04086.X. Accessed on: 16 Nov. 2021.

JENSEN, K. K.; ANDREATTA, M.; MARCATILI, P.; BUUS, S.; GREENBAUM, J. A.; YAN, Z.; SETTE, A.; PETERS, B.; NIELSEN, M. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. **Immunology**, vol. 154, no. 3, p. 394–406, 1 Jul. 2018. DOI 10.1111/IMM.12889. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29315598/>. Accessed on: 16 Nov. 2021.

KÄLLBERG, M.; WANG, H.; WANG, S.; PENG, J.; WANG, Z.; LU, H.; XU, J. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. **Nature protocols**, vol. 7, no. 8, p. 1511–1522, Aug. 2012. DOI 10.1038/NPROT.2012.085. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22814390/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

KELLEY, L. A.; MEZULIS, S.; YATES, C. M.; WASS, M. N.; STERNBERG, M. J. E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature protocols**, vol. 10, no. 6, p. 845–858, 30 Jun. 2015. DOI 10.1038/NPROT.2015.053. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25950237/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

KIMBRELL, D. A.; BEUTLER, B. The evolution and genetics of innate immunity. **Nature reviews. Genetics**, vol. 2, no. 4, p. 256–267, Apr. 2001. DOI 10.1038/35066006. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11283698/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

KORBER, B.; LABUTE, M.; YUSIM, K. Immunoinformatics comes of age. **PLoS computational biology**, vol. 2, no. 6, p. 0484–0492, 2006. DOI 10.1371/JOURNAL.PCBI.0020071. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16846250/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

KOZAKOV, D.; HALL, D. R.; XIA, B.; PORTER, K. A.; PADHORNY, D.; YUEH, C.; BEGLOV, D.; VAJDA, S. The ClusPro web server for protein-protein docking. **Nature protocols**, vol. 12, no. 2, p. 255–278, 1 Feb. 2017. DOI 10.1038/NPROT.2016.169. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28079879/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

LARSEN, M. v.; LUNDEGAARD, C.; LAMBERTH, K.; BUUS, S.; LUND, O.; NIELSEN, M. Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. **BMC Bioinformatics**, vol. 8, no. 1, p. 1–12, 31 Oct. 2007. DOI 10.1186/1471-2105-8-424/TABLES/3. Available at: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-8-424>. Accessed on: 16 Nov. 2021.

LÉVY, F. M. The fiftieth anniversary of diphtheria and tetanus immunization. **Preventive medicine**, vol. 4, no. 2, p. 226–237, 1975. DOI 10.1016/0091-7435(75)90084-5. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1098038/>. Accessed on: 15 Nov. 2021.

LUNDEGAARD, C.; LUND, O.; KEŞMİR, C.; BRUNAK, S.; NIELSEN, M. Modeling the adaptive immune system: predictions and simulations. **Bioinformatics**, vol. 23, no. 24, p. 3265–3275, 15 Dec. 2007. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm471>.
MAGNAN, C. N.; ZELLER, M.; KAYALA, M. A.; VIGIL, A.; RANDALL, A.; FELGNER, P. L.; BALDI, P. High-throughput prediction of protein antigenicity using protein microarray data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, vol. 26, no. 23, p. 2936–2943, Dec. 2010. DOI 10.1093/BIOINFORMATICS/BTQ551.

MALONIS, R. J.; LAI, J. R.; VERGNOLLE, O. Peptide-Based Vaccines: Current Progress and Future Challenges. **Chemical Reviews**, vol. 120, no. 6, p. 3210–3229, 25 Mar. 2019. DOI 10.1021/ACS.CHEMREV.9B00472.

MANAVALAN, B.; GOVINDARAJ, R. G.; SHIN, T. H.; KIM, M. O.; LEE, G. iBCE-EL: A New Ensemble Learning Framework for Improved Linear B-Cell Epitope Prediction. **Frontiers in Immunology**, vol. 9, 27 Jul. 2018. DOI 10.3389/FIMMU.2018.01695. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30100904/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

MARTINI, S.; NIELSEN, M.; PETERS, B.; SETTE, A. The Immune Epitope Database and Analysis Resource Program 2003-2018: reflections and outlook. **Immunogenetics**, vol. 72, no. 1–2, p. 57–76, 1 Feb. 2020. DOI 10.1007/S00251-019-01137-6. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31761977/>. Accessed on: 16 Nov. 2021.

MILLIGAN, R.; PAUL, M.; RICHARDSON, M.; NEUBERGER, A. Vaccines for preventing typhoid fever. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, vol. 2018, no. 5, 31 May 2018. DOI 10.1002/14651858.CD001261.

MOISA, A. A.; KOLESANOVA, E. F. Synthetic Peptide Vaccines. **Insight and Control of Infectious Disease in Global Scenario**, 21 Mar. 2012. DOI 10.5772/33496. Available at: <https://www.intechopen.com/chapters/33035>. Accessed on: 16 Nov. 2021.

NOGUEIRA, W. Imunobioinformática para leigos. **BIOINFO - Revista Brasileira de Bioinformática e Biologia Computacional**, Jul. 2021. <https://doi.org/10.51780/978-6-599-275326-06>. Accessed on: 16 Nov. 2021.

ODORICO, M.; PELLEQUER, J. L. BEPITOPE: predicting the location of continuous epitopes and patterns in proteins. **Journal of molecular recognition : JMR**, vol. 16, no. 1, p. 20–22, Jan. 2003. DOI 10.1002/JMR.602. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12557235/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

OLI, A. N.; OBIALOR, W. O.; IFEANYICHUKWU, M. O.; ODIMEGWU, D. C.; OKOYEH, J. N.; EMECHEBE, G. O.; ADEJUMO, S. A.; IBEANU, G. C. Immunoinformatics and Vaccine Development: An Overview. **ImmunoTargets and Therapy**, vol. 9, p. 13–30, 26 Feb. 2020. DOI 10.2147/ITT.S241064. Available at: <https://www.dovepress.com/immunoinformatics-and-vaccine-development-an-overview-peer-reviewed-fulltext-article-ITT>. Accessed on: 16 Nov. 2021.

OWEN, J.; PUNT, J.; STRANFORD, S. A. **Kuby immunology**. 7th ed. New York: Freeman and Co., 2013.

PARVIZPOUR, S.; POURSEIF, M. M.; RAZMARA, J.; RAFI, M. A.; OMIDI, Y. Epitope-based vaccine design: a comprehensive overview of bioinformatics approaches. **Drug Discovery Today**, vol. 25, no. 6, p. 1034–1042, 1 Jun. 2020. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2020.03.006>. Accessed on: 16 Nov. 2021.

POEHLING, K. A.; CASPARD, H.; PETERS, T. R.; BELONGIA, E. A.; CONGENI, B.; GAGLANI, M.; GRIFFIN, M. R.; IRVING, S. A.; KAVATHEKAR, P. K.; MCLEAN, H. Q.; NALEWAY, A. L.; RYAN, K.; KEIPP TALBOT, H.; AMBROSE, C. S. 2015-2016 Vaccine Effectiveness of Live Attenuated and Inactivated Influenza Vaccines in Children in the United States. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, vol. 66, no. 5, p. 665–672, 1 Mar. 2018. DOI 10.1093/CID/CIX869. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29029064/>. Accessed on: 15 Nov. 2021.

POLLARD, A. J.; BIJKER, E. M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. **Nature Reviews Immunology**, vol. 21, no. 2, p. 83–100, 22 Feb. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7>.

PONOMARENKO, J.; BUI, H. H.; LI, W.; FUSSEDER, N.; BOURNE, P. E.; SETTE, A.; PETERS, B. ElliPro: A new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. **BMC Bioinformatics**, vol. 9, no. 1, p. 1–8, 2 Dec. 2008a. DOI 10.1186/1471-2105-9-514/FIGURES/3. Available at: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-9-514>. Accessed on: 16 Nov. 2021.

PONOMARENKO, J.; BUI, H. H.; LI, W.; FUSSEDER, N.; BOURNE, P. E.; SETTE, A.; PETERS, B. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. **BMC bioinformatics**, vol. 9, 2 Dec. 2008b. DOI 10.1186/1471-2105-9-514. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19055730/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

RAEVEN, R. H. M.; VAN RIET, E.; MEIRING, H. D.; METZ, B.; KERSTEN, G. F. A. Systems vaccinology and big data in the vaccine development chain. **Immunology**, vol. 156, no. 1, p. 33–46, 1 Jan. 2019. DOI 10.1111/IMM.13012. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imm.13012>. Accessed on: 16 Nov. 2021.

RAMANA, J.; MEHLA, K. Immunoinformatics and Epitope Prediction. **Methods in Molecular Biology**, vol. 2131, p. 155–171, 2020. DOI 10.1007/978-1-0716-0389-5_6. Available at: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-0389-5_6. Accessed on: 17 Nov. 2021.

RAMMENSEE, H. G.; BACHMANN, J.; EMMERICH, N. P. N.; BACHOR, O. A.; STEVANOVIC, S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. **Immunogenetics**, vol. 50, no. 3–4, p. 213–219, 1999. DOI 10.1007/S002510050595. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10602881/>. Accessed on: 16 Nov. 2021.

RAPIN, N.; LUND, O.; BERNASCHI, M.; CASTIGLIONE, F. Computational immunology meets bioinformatics: the use of prediction tools for molecular binding in the simulation of the immune system. **PloS one**, vol. 5, no. 4, 2010. DOI 10.1371/JOURNAL.PONE.0009862. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20419125/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

RECHE, P. A.; GLUTTING, J. P.; ZHANG, H.; REINHERZ, E. L. Enhancement to the RANKPEP resource for the prediction of peptide binding to MHC molecules using profiles. **Immunogenetics**, vol. 56, no. 6, p. 405–419, Sep. 2004. DOI 10.1007/S00251-004-0709-7. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15349703/>. Accessed on: 16 Nov. 2021.

RICHMOND, P.; HATCHUEL, L.; DONG, M.; MA, B.; HU, B.; SMOLENOV, I.; LI, P.; LIANG, P.; HAN, H. H.; LIANG, J.; CLEMENS, R. Safety and immunogenicity of S-Trimer (SCB-2019), a protein subunit vaccine candidate for COVID-19 in healthy adults: a phase 1, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet**, vol. 397, no. 10275, p. 682–694, 20 Feb. 2021. DOI 10.1016/S0140-6736(21)00241-5/ATTACHMENT/CBD938FD-7B21-4AD4-8AD2-BC1780A31FD0/MMC1.PDF.

ROBBINS, J. B.; SCHNEERSON, R.; SZU, S. C.; FATTOM, A.; YANG, Y.; LAGERGARD, T.; CHU, C.; SØRENSEN, U. S. Prevention of Invasive Bacterial Diseases by Immunization with Polysaccharide-Protein Conjugates. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, vol. 146, p. 169–180, 1989. DOI 10.1007/978-3-642-74529-4_18. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-74529-4_18.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature protocols**, vol. 5, no. 4, p. 725–738, 2010. DOI

10.1038/NPROT.2010.5. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20360767/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

RUBIN, L. G.; LEVIN, M. J.; LJUNGMAN, P.; DAVIES, E. G.; AVERY, R.; TOMBLYN, M.; BOUSVAROS, A.; DHANIREDDY, S.; SUNG, L.; KEYSERLING, H.; KANG, I. 2013 IDSA Clinical Practice Guideline for Vaccination of the Immunocompromised Host. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 58, no. 3, p. e44–e100, 1 Feb. 2014. DOI 10.1093/CID/CIT684. Available at: <https://academic.oup.com/cid/article/58/3/e44/336537>. Accessed on: 15 Nov. 2021.

RUBINSTEIN, N. D.; MAYROSE, I.; MARTZ, E.; PUPKO, T. Epitopia: a web-server for predicting B-cell epitopes. **BMC bioinformatics**, vol. 10, p. 287, 14 Sep. 2009. DOI 10.1186/1471-2105-10-287. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19751513/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. BcePred: Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in Antigenic Sequences Using Physico-chemical Properties. **Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)**, vol. 3239, p. 197–204, 2004. DOI 10.1007/978-3-540-30220-9_16. Available at: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-30220-9_16. Accessed on: 17 Nov. 2021.

SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, vol. 65, no. 1, p. 40–48, 1 Oct. 2006. DOI 10.1002/PROT.21078. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/prot.21078>. Accessed on: 16 Nov. 2021.

SINGH, H.; ANSARI, H. R.; RAGHAVA, G. P. S. Improved Method for Linear B-Cell Epitope Prediction Using Antigen's Primary Sequence. **PLOS ONE**, vol. 8, no. 5, p. e62216, 7 May 2013a. DOI 10.1371/JOURNAL.PONE.0062216. Available at: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0062216>. Accessed on: 16 Nov. 2021.

SINGH, H.; ANSARI, H. R.; RAGHAVA, G. P. S. Improved method for linear B-cell epitope prediction using antigen's primary sequence. **PloS one**, vol. 8, no. 5, 7 May 2013b. DOI 10.1371/JOURNAL.PONE.0062216. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23667458/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

SORIA-GUERRA, R. E.; NIETO-GOMEZ, R.; GOVEA-ALONSO, D. O.; ROSALES-MENDOZA, S. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. **Journal of Biomedical Informatics**, vol. 53, p. 405–414, 1 Feb. 2015. <https://doi.org/10.1016/J.JBI.2014.11.003>. Accessed on: 16 Nov. 2021.

SWEREDOSKI, M. J.; BALDI, P. COBEpro: a novel system for predicting continuous B-cell epitopes. **Protein engineering, design & selection : PEDS**, vol. 22, no. 3, p. 113–120, Mar. 2009. DOI 10.1093/PROTEIN/GZN075. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19074155/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

TEBAS, P.; ROBERTS, C. C.; MUTHUMANI, K.; REUSCHEL, E. L.; KUDCHODKAR, S. B.; ZAIDI, F. I.; WHITE, S.; KHAN, A. S.; RACINE, T.; CHOI, H.; BOYER, J.; PARK, Y. K.; TROTTIER, S.; REMIGIO, C.; KRIEGER, D.; SPRUILL, S. E.; BAGARAZZI, M.; KOBINGER, G. P.; WEINER, D. B.; MASLOW, J. N. Safety and Immunogenicity of an Anti-Zika Virus DNA Vaccine. **New England Journal of Medicine**, vol. 385, no. 12, p. e35, 16 Sep. 2021. DOI 10.1056/nejmoa1708120. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34525286/>. Accessed on: 16 Nov. 2021.

TONG, J. C.; REN, E. C. Immunoinformatics: Current trends and future directions. **Drug Discovery Today**, vol. 14, no. 13–14, p. 684–689, 1 Jul. 2009. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2009.04.001>. Accessed on: 16 Nov. 2021.

TOPUZOGÜLLARI, M.; ACAR, T.; PELIT ARAYICI, P.; UÇAR, B.; UĞUREL, E.; ABAMOR, E. Ş.; ARASOĞLU, T.; TURGUT-BALIK, D.; DERMAN, S. An insight into the epitope-based peptide vaccine design strategy and studies against COVID-19. **Turkish journal of biology = Turk biyoloji dergisi**, vol. 44, no. 3, p. 215–227, 2020. DOI 10.3906/BIY-2006-1. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32595358/>. Accessed on: 16 Nov. 2021.

TORCHALA, M.; MOAL, I. H.; CHALEIL, R. A. G.; FERNANDEZ-RECIO, J.; BATES, P. A. SwarmDock: a server for flexible protein-protein docking. **Bioinformatics (Oxford, England)**, vol. 29, no. 6, p. 807–809, Mar. 2013. DOI 10.1093/BIOINFORMATICS/BTT038. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23343604/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

TOSTA, S. F. de O.; PASSOS, M. S.; KATO, R.; SALGADO, Á.; XAVIER, J.; JAISWAL, A. K.; SOARES, S. C.; AZEVEDO, V.; GIOVANETTI, M.; TIWARI, S.; ALCANTARA, L. C. J. Multi-epitope based vaccine against yellow fever virus applying immunoinformatics approaches. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1707120>, vol. 39, no. 1, p. 219–235, 2020. DOI 10.1080/07391102.2019.1707120.

URA, T.; OKUDA, K.; SHIMADA, M. Developments in Viral Vector-Based Vaccines. **Vaccines 2014, Vol. 2, Pages 624-641**, vol. 2, no. 3, p. 624–641, 29 Jul. 2014. DOI 10.3390/VACCINES2030624. Available at: <https://www.mdpi.com/2076-393X/2/3/624/html>. Accessed on: 15 Nov. 2021.

VITA, R.; MAHAJAN, S.; OVERTON, J. A.; DHANDA, S. K.; MARTINI, S.; CANTRELL, J. R.; WHEELER, D. K.; SETTE, A.; PETERS, B. The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. **Nucleic Acids Research**, vol. 47, no. D1, p. D339–D343, 8 Jan. 2019. DOI 10.1093/NAR/GKY1006.

WALKER, J. M. (Ed.). **The Proteomics Protocols Handbook**. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. DOI 10.1385/1592598900. Available at: <http://link.springer.com/10.1385/1592598900>. Accessed on: 21 Nov. 2021.

WALLIS, J.; SHENTON, D. P.; CARLISLE, R. C. Novel approaches for the design, delivery and administration of vaccine technologies. **Clinical & Experimental Immunology**, vol. 196, no. 2, p. 189–204, 1 May 2019. DOI 10.1111/CEI.13287.

YAO, B.; ZHANG, L.; LIANG, S.; ZHANG, C. SVMTriP: a method to predict antigenic epitopes using support vector machine to integrate tri-peptide similarity and propensity. **PloS one**, vol. 7, no. 9, 12 Sep. 2012. DOI 10.1371/JOURNAL.PONE.0045152. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22984622/>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

CAPÍTULO 03

Vacinas De Ácidos Nucleicos: A Nova Era Da Vacinologia Moderna

Vanessa de Melo Cavalcanti Dantas¹; Pedro Henrique Lopes Ferreira Dantas²;
Andrei Félix Mendes²; Waldecir Oliveira de Araújo Júnior³; Brenda Fernandes⁴
Lúcio Roberto Cançado Castellano⁵; Clarice Neueschwander Lins de Moraes⁶;
Christian Robson de Souza Reis⁷; Priscilla Anne Castro de Assis⁸;
Renato Antônio dos Santos Oliveira⁸; Joelma Rodrigues de Souza⁸

¹ *Doutoranda em Ciências. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde – Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ/PE*

² *Mestrando em Ciências. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde – Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ/PE*

³ *Graduado em Biotecnologia. Bolsista Técnico de Nível Superior do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental. Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ/PE*

⁴ *Graduanda em Medicina. Universidade Federal da Paraíba*

⁵ *Professor Efetivo da Escola Técnica em Saúde. Universidade Federal da Paraíba*

⁶ *Tecnologista em Saúde Pública, Pesquisadora do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental. Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ/PE*

⁷ *Tecnologista em Saúde Pública, Pesquisador do Laboratório de Microbiologia. Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ/PE*

⁸ *Docente do Departamento de Fisiologia e Patologia. Universidade Federal da Paraíba*

RESUMO

Ao final do ano de 2019, o mundo deparou-se com uma situação alarmante, diante do surgimento e rápida disseminação da Coronavirus Disease (COVID-19), e nesse cenário de pandemia, as vacinas baseadas em ácidos nucleicos (DNA/mRNA) ganharam grande destaque, uma vez que podem ser desenvolvidas rapidamente, pois requerem apenas o conhecimento prévio das sequências codificantes de proteínas virais, não necessitando de processos de cultura ou fermentação. A Vacinologia se trata de uma ciência que envolve estudos de imunógenos, indução da resposta imune do hospedeiro, avaliação clínica de vacinas e técnicas de fabricação e administração do princípio vacinal e se estima que com introdução das vacinas existentes e implementadas em programas nacionais de imunização assegura mais de 2 milhões de vidas por ano. Os avanços envolvendo o desenvolvimento de vacinas de ácidos nucleicos levaram hoje ao sucesso que vem sendo visto com as vacinas de mRNA, levando uma nova abordagem e perspectiva para essas vacinas, trazendo esperança para o surgimento de imunizantes contra doenças desafiadoras para o seu desenvolvimento. O sucesso com que as vacinas atuais emergenciais de mRNA estão sendo utilizadas para o controle da pandemia da COVID 19, viabiliza um futuro em que os imunizantes à base de DNA ou mRNA possam vir a ser a metodologia de escolha contra diferentes doenças, sobretudo contra aquelas de limitações de plataformas.

Palavras-chave: Ácidos Nucleicos. Imunizante. Vacinologia.

1. INTRODUÇÃO

Ao final do ano de 2019, o mundo deparou-se em uma situação alarmante, com o surgimento e rápida disseminação da *coronavirus disease* (COVID-19). Acompanhando a sua abrupta propagação mundial, as altas taxas de internação hospitalar e mortalidade, especialmente em pacientes com comorbidades, passaram a ser uma realidade, levando diversos países a adotar medidas de isolamento social (HU et al., 2021; WHO, 2020). Dessa forma, visando mitigar os danos causados pela disseminação da COVID-19, o rápido desenvolvimento de vacinas seguras eficazes e capazes de serem produzidas em larga escala se tornou um objetivo de central importância na comunidade sociocientífica mundial, o que proporcionou o desenvolvimento de vacinas com uma rapidez nunca vista antes na história da vacinologia, objetivando combater a disseminação do SARS-CoV-2 (SILVEIRA; MOREIRA; MENDONÇA, 2021; YU et al., 2020).

E nesse cenário de pandemia, as vacinas baseadas em ácidos nucleicos (DNA/mRNA) ganharam grande destaque, uma vez que podem ser desenvolvidas rapidamente, pois requerem apenas o conhecimento prévio das sequências codificantes virais, não necessitando de processos de cultura ou fermentação. Uma vez obtido o conhecimento das sequências codificantes de importância na geração de uma resposta imune protetora, o desenvolvimento vacinal já pode ser iniciado. Somado a isso, o desenvolvimento de vacinas baseadas em ácidos nucleicos é facilmente adaptável a diferentes patógenos, o que contribui para acelerar o seu desenvolvimento (LURIE et al., 2020; VAN RIEL; DE WIT, 2020).

As vacinas de DNA são geradas a partir da inserção de uma sequência codificante de antígenos em plasmídeos bacterianos controlados por um promotor forte e que podem ser produzidas em larga escala a partir de culturas bacterianas. Entretanto, os mecanismos exatos pelos quais o desafio imunológico com vacinas de DNA se sucede nas células do hospedeiro, induzindo subsequentemente uma resposta imune celular e/ou humoral ainda não estão totalmente esclarecidos (QIN et al., 2021).

Por outro lado, as vacinas de mRNA podem ser geradas a partir de duas abordagens distintas, denominadas vacinas de mRNA não-amplificante ou convencional e vacinas de mRNA auto-amplificante, que diferem entre si em estrutura e mecanismo de ação. As vacinas de mRNA não-amplificantes são compostas de cinco elementos críticos

para seu funcionamento, que incluem a estrutura cap 5' (ou quepe 5'), uma região codificante contendo o gene de interesse, duas regiões não codificantes flanqueando a região codificante nas extremidades 5' e 3' da sequência (5'-UTR e 3'-UTR), e uma cauda poli-A contendo de 100 a 250 nt de adenosinas na extremidade 3' (QIN et al., 2021). Por outro lado, as vacinas de mRNA auto-amplificantes são baseadas em sequências de genomas virais de RNA de fita simples de sentido positivo [ssRNA(+)] alterados por meio de engenharia genética para conterem a maquinaria replicante do genoma viral, entretanto, abstraídos de sequências codificantes de proteínas estruturais, as quais são substituídas pelo de gene de interesse (QIN et al., 2021; ZHANG et al., 2019). Nessa abordagem, os genomas dos Alphavirus são os mais comumente utilizados, e após as alterações genéticas são denominados replicons, os quais são capazes de se autorreplicarem, por meio da síntese do complexo RNA polimerase dependente de RNA, culminando em altos níveis de expressão do gene de interesse (ZHANG et al., 2019).

Entretanto, tais metodologias de desenvolvimento vacinais apresentam limitações. Para o caso das vacinas de DNA, as limitações incluem a necessidade de entrada do plasmídeo no núcleo da célula hospedeira, possibilidade teórica da integração do DNA plasmidial no genoma, manutenção da expressão do antígeno por longos prazos e baixa imunogenicidade em humanos (DEERING et al., 2014; LIU, 2019). Referente às vacinas de mRNA, a principal limitação da tecnologia é a instabilidade inerente da molécula de RNA sendo suscetível à hidrólise, o que torna o armazenamento em temperaturas entre -20°C e -80°C indispensável (SANDBRINK; SHATTOCK, 2020). Por outro lado, como fruto de um crescente interesse na tecnologia das vacinas baseadas em ácidos nucleicos, inúmeros avanços tecnológicos e inovações vêm sendo aplicados ao desenvolvimento de vacinas baseadas em ácidos nucleicos, o que vem permitindo ultrapassar as limitações supracitadas, tornando essa tecnologia altamente promissora para o desenvolvimento de imunizantes de próxima geração (LE et al., 2021).

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo esclarecer o progresso e os impactos da utilização da tecnologia de vacinas baseadas em ácidos nucleicos nas pesquisas e inovações do campo da vacinologia e no desenvolvimento de vacinas de próxima geração para a imunização contra patógenos de importância na saúde pública.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico

A molécula de DNA (do inglês, *deoxyribose nuclei acid*) foi descoberto em 1869 pelo bioquímico suíço Johann Friedrich Miescher, a partir de um estudo utilizando células de secreção de feridas, onde o mesmo observou que no núcleo celular havia uma substância rica em átomos de fósforo e de nitrogênio, ainda desconhecida, que foi denominada nucleína. Em 1889, o patologista alemão Richard Altmann comprovou em experimentos que a nucleína possuía uma natureza ácida, dando-lhe a nomenclatura de ácido nucleico (MIESCHER, 1869a; ALTMANN, 1889). Mas, até então, não se conhecia a estrutura e configuração molecular do DNA.

Desde então foi iniciado uma verdadeira corrida pela descoberta da estrutura dessa molécula, pois a comunidade científica entendia que a descoberta da estrutura molecular do DNA seria um marco histórico para ciência e para a humanidade. Foi quando em 25 de Abril de 1953, J. D. Watson e F. H. C. Crick sugeriram como seria a estrutura tridimensional do DNA (WATSON, CRICK, 1953). É importante destacar que este trabalho só se tornou possível a partir da contribuição da química e cristalógrafa Rosalind Elsie Franklin, que por dominar a técnica de difração de raio X, obteve imagens de raio X do DNA obtido de *Escherichia coli*, publicado como segunda parte do artigo de Watson e Crick (FRANKLIN, 1953).

Essa descoberta trouxe a Watson e Crick junto com o pesquisador Maurice Wilkins o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1962 e tal marco histórico abriu caminhos para o entendimento da molécula de RNA (ácido ribonucleico) e da Teoria do Código Genético, ambos na década de 1960 (NIRENBERG et al., 1963).

2.2. Estrutura e Funções dos Ácidos Nucleicos

Em humanos, o DNA é uma molécula de estrutura helicoidal, dupla-hélice composto por várias unidades de nucleotídeos. Por sua vez, esses nucleotídeos são compostos por bases nitrogenadas que podem ser do tipo púricas, adenina e guanina, e do tipo pirimídicas, citosina e timina, ligado ao carbono 1 de uma pentose, tipo

desoxirribose no carbono 2, e um grupo fosfato ligado ao carbono 5 da pentose. As fitas possuem a característica de serem complementares e antiparalelas, onde uma se inicia na extremidade do grupo fosfato 5' e encerra na extremidade da hidroxila 3', sendo chamada de sentido 5' --> 3' e sua fita complementar possui o sentido inverso, 3' --> 5'. A hélice dupla do DNA tem sua torção à direita, com um sulco maior e um sulco menor, onde uma volta completa é feita a cada 10,5 pares de bases e tem 34 Å de comprimento, a distância de cada base tem cerca de 3,4 Å de comprimento e o seu diâmetro 20 Å. Cada fita tem sua estrutura mantida, principalmente, pela presença das forças não covalentes das interações entre átomos e pelo empilhamento hidrofóbico das bases (WATSON; CRICK, 1953; ALBERTS et al., 2010). As fitas são unidas entre si através de pontes de hidrogênio que unem as bases de uma fita com a outra, obedecendo as Leis de Chargaff que diz que a Adenina se une a Timina por 2 pontes de hidrogênio e a Guanina se une a Citosina por 3 pontes de hidrogênio (STEPHEN; GEORGE; CHARGAFF, 1952). Em células eucariontes, DNA se encontra dentro do compartimento nuclear e tem como função armazenar a informação genética de um ser vivo que é traduzida em proteína a partir da transcrição da molécula intermediária mRNA - ácido ribonucleico mensageiro (COX, DOUDNA, O'DONNELL, 2012).

O RNA é uma molécula de estrutura helicoidal, fita simples também composto por várias unidades de nucleotídeos, os quais são compostos por bases nitrogenadas que podem ser do tipo púricas adenina e guanina e do tipo pirimídica citosina e uracila ao invés da base timina. Esses nucleotídeos também são ligados ao carbono 1 da pentose tipo ribose com um grupo fosfato ligado a ela. Apesar de ser uma única fita, o RNA tem a característica de se enovelar entre si através das mesmas Leis de Chargaff, de uma adenina se une a uma uracila através de 2 pontes de hidrogênio e a base guanina se une a uma citosina por 3 pontes de hidrogênio. A fita de RNA é sintetizada no sentido 5'-3' (ALBERTS et al., 2010; WEAVER, 2011)

Ao contrário do DNA que possui uma única forma e função, vários tipos de RNAs podem ser encontrados em células humanas: tem o mRNA (RNA mensageiro), também chamado de RNA codificante, que é sintetizado a partir de uma das fitas do DNA pelo processo chamado Transcrição e tem como função transportar as informações genômicas na forma de códon para a organela chamada ribossomo presente no citosol e desta informação produzir uma proteína, pelo processo chamado

Tradução; tem o tRNA (RNA transportador) que carrega o aminoácido correspondente a cada códon presente no mRNA através da ligação com anti-códon do tRNA ao códon do mRNA; tem o rRNA (RNA ribossômico) que faz parte da estrutura do ribossomo e auxilia na ligação entre mRNA e tRNA para a síntese da proteína correspondente a informação genômica (ALBERTS et al., 2010; WEAVER, 2011). Além disso, descoberto a pouco mais de 2 décadas, existem os pequenos RNAs de interferência (siRNA) e os micro RNAs (miRNA), que são RNAs não codificantes, mas possuem importante papel na regulação gênica interferindo na vida útil e função dos RNAs mensageiros agindo como silenciadores gênicos naturais (AGRAWAL et al. 2003).

2.3. Vacinologia

A Vacinologia se trata de uma ciência que envolve estudos de imunógenos, indução da resposta imune do hospedeiro, avaliação clínica de vacinas e técnicas de fabricação e administração do princípio vacinal (BARRETT, 2016). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que com introdução das vacinas existentes e implementadas em programas nacionais de imunização assegura mais de 2 milhões de vidas por ano, principalmente na faixa etária de 5 anos ou menos, reduzindo consideravelmente a taxa de mortalidade de crianças (OMS, 2013; OMS, 2020). A vacina é uma formulação de um ou mais antígenos derivados do patógeno ou produzidos sinteticamente capazes de gerar memória imunológica protetora contra uma determinada doença. Desta forma, a vacina é importante para imunidade contra o patógeno, apresentando-se como um tratamento preventivo e específico, mas também é considerada um caminho efetivo de controle de doenças infecciosas transmitidas por vetores, bem como na prevenção de uso de fármacos com toxicidade e efeitos colaterais ao hospedeiro (ALI et al., 2017).

A proteção conferida por uma vacina é medida em ensaios clínicos que relacionam as respostas imunológicas ao antígeno da vacina a desfechos clínicos, como prevenção de infecção, redução da gravidade da doença ou diminuição da taxa de hospitalização ou queda da taxa de mortalidade (PLOTKIN, 2020). Seu efeito depende do desenvolvimento da memória imunológica com a geração de células B de

memória (imunidade humoral) e células T de memória (imunidade celular) que garantam uma resposta rápida e eficaz mediante uma segunda exposição ao microrganismo que foi o alvo da vacina desenvolvida (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

A vacina depende, basicamente, de três componentes principais: o epítopo imunologicamente ativo que irá gerar a resposta imunológica; um adjuvante (como hidróxido de alumínio, virossomo, lipossomo, entre outros) que ajude na indução da resposta imune inata por células apresentadoras de antígenos, produção de coestimuladores e ativação de células T; e o sistema de apresentação desse antígeno de acordo com a via de administração da vacina (CHIN; SAN, 1998; GOTO et al., 1993; SCHIRMBECK et al., 1994; STASSIJNS et al., 2016). Adicional a esses componentes principais, as vacinas podem conter também em sua formulação final outros componentes que funcionam como conservantes, emulsionantes (como o polissorbato) ou estabilizantes (como gelatina ou sorbitol). Além disso, produtos vestigiais como antibióticos, proteínas de ovo ou levedura, látex, formaldeído e / ou gluteraldeído e acidez reguladores (como os sais de potássio ou sódio) usados na fabricação de vacinas podem também estar presentes na formulação final (MITKUS; HESS; SCHWARTZ, 2013).

A respeito das abordagens para formular uma vacina, a vacinologia clássica envolve as tecnologias de vacina inativada e viva atenuada, sendo utilizadas há muitos anos. Todavia, diversas outras tecnologias vêm sendo usadas e desenvolvidas, como vacina de subunidade, proteína isolada, peptídeos imunogênicos, vacina marcador, vacina de vetor vivo e abordagens de ácido nucleico. Nas vacinas de subunidades regiões dos microrganismos virais são selecionados como alvos, porém é uma estratégia que tende a ter imunogenicidade reduzida quando comparadas com produtos virais inteiros e para melhorar a sua eficácia são realizadas modificações na apresentação de antígenos, fornecendo glicoproteínas virais nas vesículas lipídicas, que podem ser compostas por lipídios derivados de vírus (virossomos) ou por lipídios não virais adicionados (lipossomos) que hoje em dia são chamados de partículas semelhantes a vírus (VLPs) (ALMEIDA; BRAND; EDWARDS, 1975; DE GROOT, 2006; FRANCIS, 2018).

2.4. O avanço no uso de Ácidos Nucleicos em Vacinas

No final de 1987, o pesquisador americano Robert Malone conduziu experimento que mostrou que células humanas foram capazes de produzir proteínas a partir de mRNA de outras células misturado com gotículas de gordura, demonstrando que essas gotículas de gordura poderiam facilitar a passagem do mRNA para um organismo vivo. Mas apesar desses resultados promissores, experimentos posteriores revelaram uma problemática envolvendo mRNA: molécula com alta instabilidade e que envolve técnicas muito caras para poder ser usado como potencial alvo terapêutico ou metodologia de vacina (MALONE; FELGNER; VERMA, 1989; MALONE, 1989; DOLGIN, 2021).

Mas um pouco antes disso, já em 1978, cientistas mostraram que estruturas com membranas gordurosas, chamadas de lipossomas, ajudavam no transporte de mRNA em células de camundongo e humanos para induzir a expressão de proteínas. Esses lipossomas tinham a função de empacotar e proteger o mRNA e depois se fundir com membranas células como modo de entregar o material genético às células (DIMITRIADIS, 1978; OSTRO et al., 1978).

Porém poucos pesquisadores pensavam no mRNA como um produto médico, diante da ineficácia de se produzir esse material genético em laboratório, e esse panorama só começou a mudar a partir do sucesso do experimento conduzido pelos pesquisadores Douglas Melton, Tom Maniatis, Michael Green e Paul Krieg, que sintetizaram mRNA a partir de uma polimerase viral. Posteriormente, a técnica foi vendida à empresa Promega Corporation™ (KRIEG; MELTON, 1984; MELTON et al., 1984; DOLGIN, 2021).

Mais tarde, em 1992, cientistas do Scripps Research Institute em La Jolla, usaram mRNA para tratamento de um distúrbio metabólico raro, e 1993 pesquisadores da empresa francesa, Transgène™, liderada pelo pesquisador Pierre Meulien, demonstraram que o mRNA em um lipossomo poderia gerar uma resposta imune antiviral específica em camundongos (JIRIKOWSKI et al., 1992; MARTINON et al., 1993).

O grande marco nos estudos com mRNA se deu em 1997 com trabalhos desenvolvidos pela pesquisadora Katalin Karikó e Drew Weissman baseados nos trabalhos iniciais do Robert Malone. Nestes trabalhos, eles descobriram que fazer

modificações química no nucleotídeo uridina, criando um análogo, pseudouridina, impediria a célula de identificar o mRNA sintético como corpo estranho que levava a reações inflamatórias intensas e levaria à célula a produzir adequadamente a proteína derivada desse mRNA. Essa técnica foi vendida à empresa UPenn™, agora chama de Cellscript, que sublicencia a metodologia para as empresas Moderna™ e BioNTech™ pioneiras nas primeiras vacinas de mRNA para a COVID-19 (KARIKÓ et al., 2004; KARIKÓ et al., 2005; DOLGIN, 2021).

Quanto às tecnologias fundamentais, muitos especialistas destacam o uso das nanopartículas lipídicas, ou LNPs, que protegem o mRNA e o transportam para as células como uma grande inovação para o sucesso das vacinas de mRNA. Essa tecnologia vem do laboratório de Pieter Cullis, bioquímico da University of British Columbia em Vancouver, Canadá, e de várias empresas que fundou ou liderou. No final da década de 1990, eles foram os pioneiros dos LNPs na entrega de fitas de ácidos nucleicos que silenciam a atividade do gene. As nanopartículas possuem quatro moléculas de gordura, onde três contribuem para a estrutura e estabilidade e o lipídio ionizável que possui carga positiva em condições de laboratório, o que oferece vantagens semelhantes aos lipossomas que Felgner desenvolveu e Malone testou no final dos anos 1980. Esses lipídios ionizáveis desenvolvidos por Cullis e seus parceiros comerciais se convertem em uma carga neutra em condições fisiológicas como as da corrente sanguínea, o que limita os efeitos tóxicos no corpo. Além disso, esse tipo de LNP permite que o produto vacinal seja armazenado por mais tempo na prateleira da farmácia e mantenha sua estabilidade dentro do corpo. Além disso, o coquetel de quatro lipídios permite que o produto seja armazenado por mais tempo na prateleira da farmácia e mantenha sua estabilidade dentro do corpo (DOLGIN, 2021).

Todos esses avanços somados levaram hoje ao sucesso que vem sendo visto com as vacinas de mRNA, levando a uma nova abordagem e perspectiva com as vacinas de ácidos nucleicos, trazendo esperança para o surgimento de vacinas contra doenças desafiadoras para o seu desenvolvimento, a exemplo a vacina contra a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), causado pela infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 RNA como produto vacinal

Com o avanço no conhecimento acerca do RNA e sua natureza molecular, cientistas propuseram o primeiro uso do mRNA como um tratamento, sendo realizados os primeiros testes em ratos com diabetes insipidus, onde a aplicação de mRNA sintético codificante para a vasopressina levou à uma reversão temporária no quadro diabético do animal (JIRIKOWSKI et al., 1992). O uso do mRNA logo foi associado a um novo sistema de entrega de partículas baseado em lipídeos, denominado lipossomas (WOLFF et al., 1990). Finalmente, a primeira vacina de mRNA existente foi desenvolvida contra o vírus da Influenza, utilizando o gene codificante para a nucleoproteína. A vacina foi testada em camundongos e foi capaz de elicitar resposta imunológica dependente de células T específicas para infecções virais (MARTINON et al., 1993). Em 1995, uma nova abordagem foi aplicada no tratamento de tumores em ratos. Utilizando o mRNA codificante do antígeno carcinoembrionário humano (CEA), um importante marcador tumoral super expresso em carcinomas (EIDELMAN et al., 1993), os pesquisadores observaram um estímulo imunológico e produção de anticorpos anti-CEA 3 semanas após as aplicações, expondo a viabilidade de uma vacina de mRNA no tratamento tumoral (CONRY et al., 1995). Subsequentemente, novos achados foram obtidos e o desenvolvimento de uma promissora e nova plataforma vacinal baseada em ácidos nucleicos estimulou vários estudos a partir do início dos anos 2000. Moléculas de RNA codificando o antígeno MPT83 de *Mycobacterium tuberculosis* foram capazes de estimular uma modesta resposta imunológica celular e humoral em camundongos (XUE et al., 2004). Em outro estudo, pesquisadores utilizando uma sequência gênica de RNA codificante para um potencial oncogene, a proteína E7 do papilomavírus humano (HPV), mostraram o potencial do imunizante em estimular uma resposta imunológica dependente de células NK em camundongos transfectados com células tumorais. Tal mecanismo se mostra muito importante em um contexto onde o tumor afeta negativamente a expressão de MHC de classe I (CHENG et al., 2004).

Evidenciando a evolução da tecnologia de vacinas de material genético, houve um estudo de 2013 a 2016 o primeiro ensaio clínico para testar uma vacina profilática

baseada em mRNA que codifica a glicoproteína do vírus da raiva (ALBERER, 2017), cujos resultados serviram como base para um ensaio clínico em 2018 de uma vacina anti-rábica à base de mRNA formulada com nanopartículas lipídicas, que obteve o resultado de que lipídios encapsulados protegem a molécula de mRNA em humanos e, portanto, aumentam a geração de respostas imunes protetoras (ALDRICH, 2021). Ademais, outra evidência da evolução científica no quesito vacinas genéticas há a utilização de nanopartículas lipídicas em uma vacina de RNAm para influenza em 2015, sendo que essa tecnologia inicialmente foi testada em ratos em 2012 (DOLGIN, 2021).

Recentemente, as vacinas de ácidos nucleicos ganharam destaque na comunidade científica e na mídia pelo seu uso na pandemia da COVID-19 e por apresentarem alta taxa de eficácia, onde esta tecnologia de mRNA já se encontra em ampla distribuição na população, como vacina de uso emergencial. A primeira vacina a ser liberada para uso foi a BNT162b2 usando mRNA do gene da proteína Spike do SARS-CoV-2 pelas empresas alemãs Pfizer™ e BioNTech™, exibindo uma eficácia final de 95% (POLACK et al., 2020) e a outra vacina da mesma metodologia é a mRNA-1273 produzida pela empresa americana Moderna, que também utiliza mRNA do gene da proteína Spike, tendo uma eficácia final de 94.1% (BADEN et al., 2021), ambas foram as vacinas que apresentaram maior taxa de eficácia quando comparados às demais vacinas em uso contra a COVID-19, demonstrando o alto potencial preventivo e terapêutico que essa metodologia tem se apresentado.

3.2 Vacinas de DNA

A estrutura das vacinas de DNA está contida na ideia da transferência de um DNA recombinante, por técnicas que mudaram ao longo da linha do tempo da ciência (GURUNATHAN et al, 2000). Nesse sentido, o histórico de abordagem de DNA perpassou as técnicas de lipossomos e proteolipossomos (NICOLAU, 1983), de DNA precipitado com fosfato de cálcio (BENVENISTY; RESHEF, 1986), de glicoproteína covalentemente ligada a poli-L-lisina (GY; CH, 1988) e de plasmídeo recombinante (TANG; DEVIT; JOHNSTON, 1992). Assim, trabalhos com vacinas de DNA começaram mostrando a proteção contra influenza em ratos (ULMER, 1993) e galinhas (ROBINSON; HUNT; WEBSTER, 1993), fatos esses essenciais para o

aprimoramento da técnica de construção de vacinas de DNA, sendo que atualmente há vacinas em fase experimental de DNA para COVID-19, Tuberculose e coadjuvante no tratamento contra o câncer.

Acerca das vacinas de DNA para COVID-19, tem-se a COVID-eVax, desenvolvida com a parceria entre as empresas Takis™ e Rottapharm Biotech™ cujo plasmídeo codifica uma forma monomérica secretada da região RBD da proteína Spike do SARS-CoV-2 S que induz respostas potentes com anticorpos neutralizantes, além de uma resposta de células T (CONFORTI et al, 2021). Outra vacina de DNA em fase de teste contém o plasmídeo pGX9501, da empresa de biotecnologia Inovio Pharmaceuticals™, projetado para codificar a proteína Spike, foi avaliado como um antígeno (SILVEIRA; MOREIRA; MENDONÇA, 2021). Adicionalmente, há um estudo clínico em andamento com a ideia de usar nanopartículas para mediar a entrega bem-sucedida de vacinas de DNA ou mRNA, que visa, portanto, a proteção desse material genético até que seja entregue ao seu respectivo alvo (HO, 2021). Como pontos positivos para vacinas de DNA para COVID-19, vale ressaltar que as sequências CpG não metiladas do DNA de plasmídeo podem ativar a resposta imune inata, fato esse que é de extrema importância, pois mesmo que vacinas de DNA em humanos tenham induzido respostas celulares e humorais, sendo que isoladamente nem sempre são suficientes para obter benefícios clínicos significativos para o paciente (SILVEIRA; MOREIRA; MENDONÇA, 2021). Outrossim, na existência de variantes de preocupação, decorrentes de mutações no genoma do SARS-COV-2, onde há rápida e intensa disseminação do vírus mundialmente, é necessário compreender que a resposta imunológica contra o SARS-CoV-2 pode levar ao aumento dependente de anticorpos (ADE), sendo essa uma situação passível de resolução pelas vacinas de DNA e RNA, pela a possibilidade de manipular ou remover as regiões da vacina responsáveis pelo ADE (SILVEIRA; MOREIRA; MENDONÇA, 2021).

Para a vacina de DNA contra tuberculose, há diversas opções viáveis de vacinas de DNA em estudo, tais como a co-imunização com diferentes vetores e utilização de genes híbridos ou de plasmídeos vetoriais com multipromoção (MOBED, 2020).

Acerca da possibilidade da ajuda da vacinologia no combate ao câncer, tem-se um estudo onde uma vacina de nanodispositivos de DNA estimulou uma resposta de célula T antígeno-específica controlada e robusta, com subsequente regressão do tumor e geração de respostas de células T de longo prazo, ambos em camundongos (LIU et al, 2020).

Para todas as vacinas de DNA citadas, há prós e contras. Acerca das vantagens, as vacinas de DNA possuem facilidade de manipulação com uso de tecnologia genérica e simplicidade de fabricação (WHALEN, 1996). Ademais, vacinas de DNA possuem indução de respostas imunológicas sem associação a microrganismos em replicação; construção de um vetor que em uma vacina codifica diferentes antígenos e alta estabilidade química e biológica para armazenamento (SILVEIRA; MOREIRA; MENDONÇA, 2021). Sobre os pontos negativos, deve-se observar, por exemplo, que há riscos de integralização de DNA em células humanas pela inserção em genoma viral (GURUNATHAN et al, 2000). Além disso, o antígeno codificado pelos genes imunológicos deve ser proteico (MOBED, 2020). Sendo, assim, mais estudos na área devem ser realizados no intuito de atenuar ou extinguir os pontos negativos das vacinas de DNA, além de poder fornecer resultados consolidados mais promissores para a medicina, após essa fase de estudos clínicos recentes.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de anos de estudos buscando tornar possível o uso de vacinas de ácidos nucleicos, o sucesso com que as vacinas atuais emergenciais de mRNA usadas para o controle da pandemia da COVID-19 mostrou um caminho viável para que esses tipos de vacinas sejam aplicáveis e se torne um novo caminho para doenças que são verdadeiros desafios para o desenvolvimento de uma vacina eficaz, como a vacina contra o HIV.

Este atual cenário viabiliza um futuro em que os imunizantes a base de DNA ou mRNA possam a vir ser a metodologia de escolha para o controle de uma doença, por se tratar de um método de rápida adaptação principalmente quando se estar diante da circulação de variantes preocupantes que podem levar a uma redução de eficácia de vacinas já em uso. Acredita-se que o maior impasse ainda seja o alto custo que esta

metodologia exige para a sua elaboração quanto à estrutura laboratorial e insumos necessários, necessitando de grande investimento para sua execução, o que torna o seu estudo restrito a grandes empresas e laboratórios de pesquisa, e para que avanços científicos ainda maiores sejam alcançados, faz-se necessário que outros laboratórios e pesquisadores possam contribuir com estudos nessa área. Desta forma, é possível que o futuro da Vacinologia Moderna esteja se construindo para um futuro de vacinas de ácidos nucleicos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 9a Ed, São Paulo: Elsevier, 2019.

AGRAWAL, N. et al. RNA interference: biology, mechanism, and applications. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v 67, p 657-685, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.4.657-685.2003>

ALBERER, M. *et al.* Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial. **The Lancet**, set. 2017. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)31665-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)31665-3)

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5 edições, Artmed, Porto Alegre, 2010.

ALDRICH, C. *et al.* Proof-of-concept of a low-dose unmodified mRNA-based rabies vaccine formulated with lipid nanoparticles in human volunteers: A phase 1 trial. **Vaccine**, fev. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.12.070>

ALI, M. et al. Exploring dengue genome to construct a multi-epitope based subunit vaccine by utilizing immunoinformatics approach to battle against dengue infection. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-09199-w>

ALMEIDA, J. A.; BRAND, C.; EDWARDS, D. C. Formation of virosomes from influenza subunits and liposomes. **Lancet**, v 2, p 899–901, 1975. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(75\)92130-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(75)92130-3)

ALTMANN, R. Ueber Nucleinsäuren. **Arch. Anat. Physiol., Physiol. Abtheil.**, v. 8, p 524-536, 1889.

BADEN, L. R. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. **NEJM**, v. 384, p. 403-416, 2021. DOI: [10.1056/NEJMoa2035389](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389)

BARRETTI, A. D. T. Vaccinology in the twenty-first century. **NPJ Vaccines**, v 1, 16009, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/npjvaccines.2016.9>

BENVENISTY, N; RESHEF, L. Direct introduction of genes into rats and expression of the genes. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, p. 9551-9555, dez. 1986. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.83.24.9551>

CHIN, J.; SAN, G. F. Skin delivery of a hybrid liposome/ISCOM vaccine implicates a role for adjuvants in rapid modulation of inflammatory cells involved in innate immunity before the

enhancement of adaptive immune responses. **Immunol Cell Biol.**, v 76, p 245-55, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.1998.00742.x>

CONFORTI, A. *et al.* COVID-eVax, an electroporated DNA vaccine candidate encoding the SARS-CoV-2 RBD, elicits protective responses in animal models. **Molecular Therapy**, set. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.09.011>

COX, M.; DOUDNA, J.; O'DONNELL, M. **Biologia Molecular- Princípios e Técnicas**. 1 edição., Artmed, Porto Alegre, 2012.

DIMITRIADIS, G. J. Translation of rabbit globin mRNA introduced by liposomes into mouse lymphocytes. **Nature**, v. 274, p. 923–924, 1978. DOI: <https://doi.org/10.1038/274923a0>

DE GROOT, A. S. Immunomics: discovering new targets for vaccines and therapeutics. **Drug Discov Today**, v 11, n 5-6, p 203–209, 2006. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1359-6446\(05\)03720-7](https://doi.org/10.1016/s1359-6446(05)03720-7)

DEERING, R. P. *et al.* Nucleic acid vaccines: Prospects for non-viral delivery of mRNA vaccines. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, n. 6, p. 885–899, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.901308>

DOLGIN, E. The tangled history of mRNA vaccines. **Nature**, v. 597, p. 318-324, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/d41586-021-02483-w>

FRANCIS, M. J. Recent Advances in Vaccine Technologies. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, v 48, n 2, p 231–241, 2018. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.cvsm.2017.10.002>

FRANKLIN, R. E. Molecular Structure of Nucleic Acid – Molecular Structure of Deoxypentose Nucleic Acids. **Nature**, v. 171, n. 4356, 1953. DOI: <https://doi.org/10.1038/171737a0>

GOTO, N. *et al.* Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. **Vaccine**, v 11, p 914-8, 1993. DOI: [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(93\)90377-a](https://doi.org/10.1016/0264-410x(93)90377-a)

GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D. M.; SEDER, R. A. DNA vaccines: immunology, applications, and optimization. **Annual Review of Immunology**, California, v.18, p.927-974, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.927>

GY, WU; CH, WU. Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 89, p. 14621-14624, out. 1988.

HO, W. *et al.* Next-Generation Vaccines: Nanoparticle-Mediated DNA and mRNA Delivery. **Advanced Healthcare Materials**, jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/adhm.202001812>

HU, B. *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141–154, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>

JIRIKOWSKI, G. F. *et al.* Reversal of Diabetes Insipidus in Brattleboro Rats: Intrahypothalamic Injection of Vasopressin mRNA. **Science**, v. 255, p. 996-998, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1546298>

KARIKÓ, K. *et al.* mRNA is an Endogenous Ligand for Toll-like Receptor 3. **Biol. Chem.**, v. 279, p. 12542-12550, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.m310175200>

KARIKÓ, K. et al. Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors: The impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA. **Immunity**, v. 23, p.165-175, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.06.008>

KRIEG, P. A.; MELTON, D. A. Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. **Nucleic Acids Res.**, v. 12, p. 7057–7070, 1984. DOI: [10.1093/nar/12.18.7057](https://doi.org/10.1093/nar/12.18.7057)

MALONE, R. W.; FELGNER, P. L.; VERMA, I. M. Cationic liposome-mediated RNA transfection. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 6077–6081, 1989. DOI:

LE, T. K. et al. Nucleic Acid-Based Technologies Targeting Coronaviruses. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 46, n. 5, p. 351–365, 2021. DOI: [10.1073/pnas.86.16.6077](https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6077)

LIU, S. *et al.* A DNA nanodevice-based vaccine for cancer immunotherapy. **Nature**, set. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41563-020-0793-6>

LIU. A Comparison of Plasmid DNA and mRNA as Vaccine Technologies. **Vaccines**, v. 7, n. 2, p. 37, 24 abr. 2019. DOI: <https://dx.doi.org/10.3390/v7020037>

LURIE, N. et al. Developing Covid-19 Vaccines at Pandemic Speed. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 21, p. 1969–1973, 21 maio 2020. DOI: <https://doi.org/10.1056/nejmp2005630>

MALONE, R. W. mRNA transfection of cultured eukaryotic cells and embryos using cationic liposomes. **Focus**, v. 11, p. 61-66, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6077>

MARTINON, F. et al. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. **EUR. J. Immunol.**, v. 23, p. 1719-1722, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.1830230749>

MELTON, DA et al. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. **Nucleic Acids Res.**, v. 12, p. 7035–7056, 1984. DOI: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/12.18.7035>

MIESCHER, F. **Die Histochemischen und Physiologischen Arbeiten von Friedrich Miescher** - Aus dem wissenschaft-lichen Briefwechsel von F. Miescher, vol 1. F. C. W. Vogel, Leipzig, p 33–36, 1869a.

MITKUS, R. J.; HESS, M. A.; SCHWARTZ, S. L. Pharmacokinetic modeling as an approach to assessing the safety of residual formaldehyde in infant vaccines. **Vaccine**, v 31, p 2738– 2743, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.03.071>

MOBED, A. DNA Based Vaccines against Mycobacterium Tuberculosis: Recent Progress in Vaccine Development and Delivery System. **Iranian Journal Of Immunology**, dez. 2020. DOI: <https://doi.org/10.22034/iji.2020.87480.1806>

NICOLAU, C *et al.* In vivo expression of rat insulin after intravenous administration of the liposome-entrapped gene for rat insulin I. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, p. 1068-1072, fev. 1983. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.80.4.1068>

NIRENBERG, M. W. et al. On the coding of genetic information. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol.**, v 28, p 549–557, 1963. DOI: [10.1101/SQB.1963.028.01.074](https://doi.org/10.1101/SQB.1963.028.01.074)

OMS. Organização Mundial de Saúde. **Global vaccine action plan 2011–2020**. (2013). Disponível em: < https://www.who.int/immunization/global_vaccine_action_plan/GVAP_doc_2011_2020/en/>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2021.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **Child mortality and causes of death**. (2020). Disponível em: < https://www.who.int/gho/child_health/mortality/mortality_under_five_text/en/>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2021.

OSTRO, M. J. et al. Evidence for translation of rabbit globin mRNA after liposome mediated insertion into a human cell line. **Nature**, v. 274, p. 921–923, 1978. DOI: <https://doi.org/10.1038/274921a0>

PLOTKIN, S. A. Updates on immunologic correlates of vaccine-induced protection. **Vaccine**, v 38, p 2250–2257, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.10.046>

POLACK, F. P. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. **NEJM**, v. 383, p. 2603–2615, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1056/nejmoa2110345>

QIN, F. et al. A Guide to Nucleic Acid Vaccines in the Prevention and Treatment of Infectious Diseases and Cancers: From Basic Principles to Current Applications. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n. May, p. 1–13, 2021. DOI: <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffcell.2021.633776>

ROBINSON, H.I.; HUNT, L.A.; WEBSTER, RG. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. **Vaccine**, 1993. DOI: [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(93\)90385-b](https://doi.org/10.1016/0264-410x(93)90385-b)

SANDBRINK, J. B.; SHATTOCK, R. J. RNA Vaccines: A Suitable Platform for Tackling Emerging Pandemics? **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. December, p. 1–9, 2020. DOI: <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffimmu.2020.608460>

SCHIRMBECK, R. et al. Immunization with soluble hepatitis B virus surface protein elicits murine H-2 class I-restricted CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte responses in vivo. **J Immunol.** v 152, p 1110–1119, 1994.

SILVEIRA, M. M.; MOREIRA, G. M. S. G.; MENDONÇA, M. DNA vaccines against COVID 19: Perspectives and challenges. **Life Sciences**, v. 267, n. September 2020, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118919>

STASSIJNS, J. et al. A systematic review and meta-analysis on the safety of newly adjuvanted vaccines among children. **Vaccine**, v. 34, p. 714–722, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.12.024>

STEPHEN Z.; GEORGE, B.; CHARGAFF, E. On the desoxypentose nucleic acids from several microorganisms. **Biochim. Et Biophys. Acta.**, v. 9, p. 402, 1952. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(52\)90184-4](https://doi.org/10.1016/0006-3002(52)90184-4)

TANG, DC; DEVIT, M; JOHNSTON, SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. **Nature**, p. 152–154, mar. 1992. DOI: <https://doi.org/10.1038/356152a0>

ULMER, J.B. *et al.* Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. **Science**, mar. 1993. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.8456302>

VAN RIEL, D.; DE WIT, E. Next-generation vaccine platforms for COVID-19. **Nature Materials**, v. 19, n. 8, p. 810–812, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41563-020-0746-0>

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acid – A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, 1953. DOI: <https://doi.org/10.1038/171737a0>

WEAVER, R. **Molecular Biology**. 5 edição. McGraw-Hill Education, 2011.

WHALEN, R. G. DNA vaccines for emerging infectious diseases: what if? **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.2, n.3, p.168-175, 1996. DOI: <https://dx.doi.org/10.3201%2Fcid0203.960302>

WHO. **Coronavirus disease (COVID-19) Pandemic**. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>>. Acesso em: 10 de outubro 2021.

YU, J. et al. DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. **Science**, v. 369, n. 6505, p. 806–811, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abc6284>

ZHANG, C. et al. Advances in mRNA vaccines for infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAR, p. 1–13, 2019. DOI: <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffimmu.2019.0059>

CAPÍTULO 04

Vacinas De mRNA - A Estrada Até Aqui

Anna Victória Bernardes e Borges¹
Emília de Freitas Beirigo²
Thaís Soares Farnesi-de-Assunção¹
Carlo José Freire de Oliveira³
Lúcio Roberto Cançado Castellano.⁴
Virmondes Rodrigues Jr.³
Marcos Vinícius da Silva³

1 - Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Infectologia. Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

2 - Curso de graduação em Biomedicina. Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

3 - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

4 - Professor da Escola Técnica de Saúde – ETS, UFPB.

RESUMO

A criação e aprimoramento de vacinas são marcos da evolução científica. Inovações nas áreas de biologia molecular, engenharia genética e imunologia tornaram possível a criação de vacinas baseadas em ácidos nucleicos, como as de mRNA. Embora esta estratégia de desenvolvimento de vacinas já estivesse sendo investigada para diversas condições, como tumores e doenças infecciosas, a pandemia da COVID-19 impôs um novo e urgente desafio a ser enfrentado, culminando com o desenvolvimento de imunizantes que se mostraram eficazes e seguros. Aqui apresentamos um panorama geral sobre as bases conceituais que norteiam esta estratégia vacinal e que culminaram em produtos já translacionados para o uso em humanos.

Palavras-chaves: mRNA. Vacinas. Biotecnologia. COVID-19. Doenças infecciosas.

1. mRNA: OS MENSAGEIROS DA VIDA

Seres vivos são formados por uma ou mais células e possuem material genético, armazenando suas informações hereditárias utilizando o ácido desoxirribonucleico (DNA) (CRICK, 1963; SMELLIE, 1965), e as expressando através do ácido ribonucleico (RNA) (VAISMAN; WOODGATE, 2018). Os ácidos nucleicos são longas cadeias poliméricas, de sentido 5' - 3', formadas por nucleotídeos, que são compostos estruturalmente por bases nitrogenadas, pentose e grupo fosfato (ZAHID *et al.*, 2013; VAISMAN; WOODGATE, 2018; MIKKOLA, 2020).

O DNA é um tipo de ácido nucleico, em forma de dupla hélice, que armazena e transmite as informações biológicas. Entretanto, apenas copiar suas próprias informações e armazenar não são suficientes para o funcionamento do ser vivo. O DNA deve permitir que a informação que contém seja expressa para que a célula produza proteínas necessárias para sua sobrevivência. Para isto, ocorre o processo conhecido como transcrição, onde o DNA serve de molde para a produção dos RNAs com apenas uma cadeia polimérica (RICH, 2006; KAPRANOV; WILLINGHAM; GINGERAS, 2007).

Em eucariotos, o processo de transcrição gênica é realizado utilizando cada fita do DNA como um molde, ocorrendo pareamento das bases nitrogenadas por complementaridade e a polimerização de uma fita realizada por enzimas RNA-polimerases, gerando um polímero transcrito de RNA fita simples de uma região específica do DNA, ou seja, uma molécula mensageira da informação genética original, o RNA mensageiro (mRNA) (PERSSON; MUELLER, 2018; DAI; ZHANG; ZALETA-RIVERA, 2020).

Na molécula de RNA mensageiro (mRNA) os códons, trinca de bases nitrogenadas, determinam o aminoácido que será utilizado para a produção de proteínas, um processo denominado de tradução. Contudo, a adição destes aminoácidos depende de moléculas adaptadoras, os RNAs transportadores (tRNA), que medeiam a transição entre as informações genéticas carregadas pelo mRNA e os produtos proteicos gerados. Outro RNA importante neste processo de tradução é o RNA ribossômico (rRNA), que não possui informações para serem traduzidas, mas juntamente com as proteínas formam os ribossomos. Os ribossomos existem em todos

os tipos de células e catalisam a síntese de proteínas das células, devido o encontro do mRNA e tRNA, para traduzir o código genético (TAKADA *et al.*, 2016; DAI; ZHANG; ZALETA-RIVERA, 2020).

O processo de geração de mRNA é complexo e envolve diversas etapas, com o intuito de levar esse transcrito à sua forma madura e funcional. Essas etapas envolvem a modificação das extremidades 5' e 3' e a remoção de íntrons (RICHARD; VETHANTHAM; MANLEY, 2017). Após a RNA-polimerase II ter produzido aproximadamente 25 nucleotídeos de RNA, ocorre o capeamento da extremidade 5', onde a mesma é modificada pela adição de um nucleotídeo guanina modificado, chamado de cap. O capeamento é importante para a exportação e processamento dos futuros mRNAs fora do núcleo, além de ajudar os componentes celulares a diferenciar os mRNAs dos outros tipos de RNAs (RAMANATHAN; ROBB; CHAN, 2016; GALLOWAY; COWLING, 2020). A molécula formada é então chamada de pré-mRNA e podem possuir em sua extensão grandes sequências não codificantes, os íntrons, que interpõem as sequências codificadoras, os éxons. Para que não ocorram erros durante a tradução proteica, as sequências dos íntrons precisam ser removidas do RNA por meio de um processo chamado splicing de RNA (LEE; RIO, 2015). Por último, ocorre a poliadenilação na extremidade 3' através de enzimas de processamento do RNA. Assim como nas outras etapas, a RNA-polimerase II à medida que aproxima-se do final da transcrição do gene, emite sinais e então o pré-mRNA é clivado da polimerase e a enzima poli-A-polimerase adiciona aproximadamente 200 nucleotídeos de adenina (A), um a um, à extremidade 3' produzida pela clivagem (MERRICK, 1992; TIAN; MANLEY, 2017; STEWART, 2019).

Essas modificações permitem que a célula verifique se as informações poderão ser interpretadas na sequência e forma correta. O material restante dos processos ou mRNA defeituosos são retidos no núcleo e degradados, enquanto o mRNA maduro e íntegro é exportado do núcleo para o citoplasma, iniciando o processo de tradução (IBBA; SÖLL, 2000).

2. VACINAS DE mRNA: NOVOS PAPÉIS PARA ANTIGOS ATORES

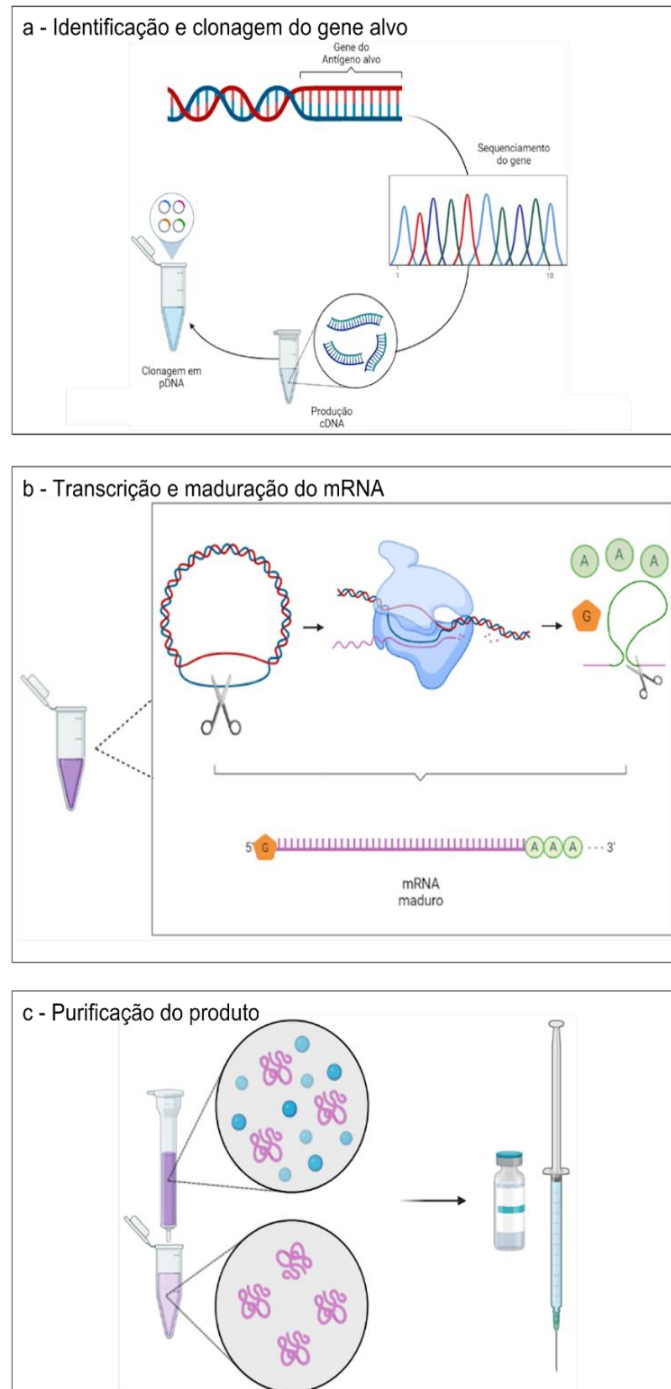
Alguns dos episódios mais importantes na história da ciência foram a conceituação e o desenvolvimento de vacinas e seus respectivos impactos na saúde e longevidade humana (PLOTKIN, 2014; ZHANG *et al.*, 2019). Os benefícios das estratégias de vacinação de sucesso são evidentes, produzindo efeitos protetivos diretos em quem se imuniza e indiretos entre indivíduos não vacinados (HARDT *et al.*, 2016). O principal objetivo de todas as estratégias de vacinação é controlar/erradicar o número de casos ou a gravidade de determinadas doenças através da indução de resposta imune específica ao agente causais, processo que pode envolver diversas estratégias (HARDT *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2019; BORAH *et al.*, 2021).

Nos séculos seguintes à sua criação, a metodologia de desenvolvimento das vacinas era através do isolamento, inativação ou administração de uma versão atenuada do patógeno, que induzia a produção de resposta imune humoral e celular (PLOTKIN; PLOTKIN, 2011; RAUCH *et al.*, 2018; MARUGGI *et al.*, 2019). Tal estratégia continua sendo utilizada, porém com limitações quanto à eficácia em diversas populações e para vários patógenos. Neste sentido, inovações nas áreas de biologia molecular, engenharia genética e imunologia tornaram possível a criação de novos modelos de desenvolvimento de vacinas sintéticas, dentre elas a produção de vacinas baseadas em ácidos nucleicos, como as de mRNA. Estas vacinas mimetizam a infecção através da codificação de mRNA específico do patógeno, possuem alta eficácia, menor custo e rápido desenvolvimento, tornando-as ideais para respostas rápidas em casos de doenças (re)emergentes, caracterizadas por imprevisibilidade, alta morbidade e disseminação, e impacto socioeconômico substancial (PARDI *et al.*, 2018; MARUGGI *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019).

De maneira geral, considerando que o mRNA é um carreador de informações genéticas usado como modelo para produção de proteínas endógenas. Uma vez que o antígeno de escolha é identificado, o gene é sequenciado e clonado em plasmídeos (Fig. 1a). Em seguida, o mRNA é transcrito *in vitro* e posteriormente purificado (Fig. 1b) e sua forma madura irá compor a vacina administrada (Fig. 1c). Na célula hospedeira do indivíduo vacinado, esse mRNA é traduzido no antígeno

correspondente, permitindo a geração de uma resposta imunológica humoral e celular (RAUCH *et al.*, 2018; MARUGGI *et al.*, 2019; BORAH *et al.*, 2021).

Figura 1 – Principais etapas para desenvolvimento de vacina de mRNA.



Legenda: Desenvolvimento da vacina de mRNA. Representação esquemática das etapas do desenvolvimento vacinal. (a) Identificação e sequenciamento do antígeno-alvo e produção do DNA complementar com posterior clonagem em DNA plasmidial (pDNA) de *Escherichia coli*. (b) O mRNA é transcrito, usando como molde o pDNA que contém o gene alvo e posteriormente é linearizado produzindo o mRNA maduro. (c) Etapa de purificação do transcrito onde ao final do procedimento um único produto de mRNA puro é obtido na sua forma madura e entregue à população como componente vacinal.

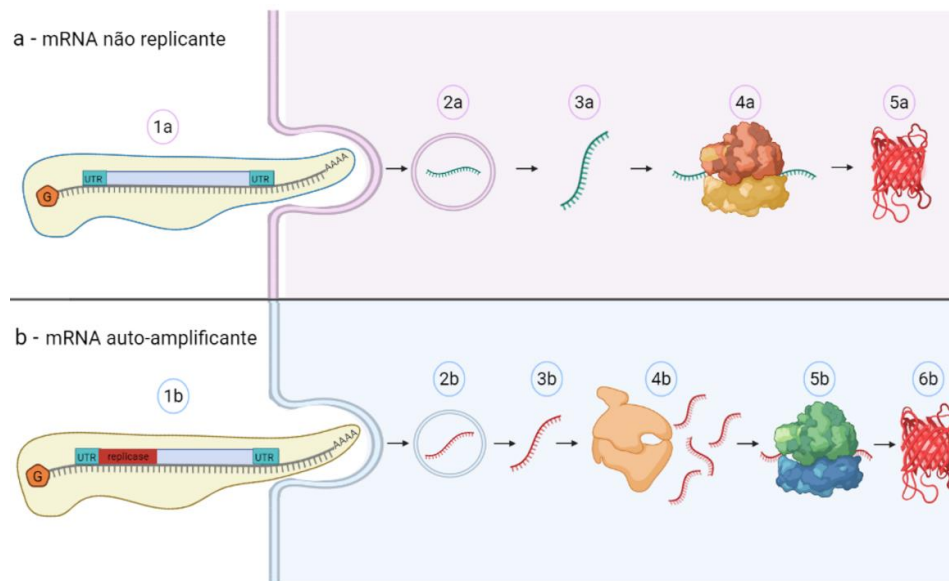
Fonte: Autoria própria, criado com BioRender.com.

A tecnologia de produção de vacinas de mRNA está constantemente sendo aperfeiçoada, sendo dois principais tipos de mRNA produzidos: mRNA não replicante e mRNA auto amplificante.

O mRNA não replicante possui estrutura simples, RNA de tamanho pequeno, região 5' capeadas e cauda poli-A, além de uma única fase de leitura aberta (ORF), sendo a sequência do antígeno de escolha que codificará a proteína, garantindo que quaisquer proteínas codificadas adicionais que poderiam induzir respostas imunes indesejadas estejam ausentes (Fig. 2a). Seu desenvolvimento *in vitro* inicia-se com a identificação do gene que irá transcrever o antígeno alvo, seu sequenciamento, produção de molde de DNA complementar e clonagem no DNA plasmidial (pDNA) de *Escherichia coli*. O molde de pDNA é transcrito *in vitro* por uma mistura de RNA-polimerase dependente de DNA de fago recombinante e nucleosídeos trifosfatos (NTPs). Após a transcrição é necessário purificar o produto obtido para remover impurezas e ao final do procedimento um único produto de mRNA puro é obtido (RAUCH *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2021).

O mRNA de auto amplificação (saRNA, do inglês “*self-amplifying RNA*”) possui elementos essenciais, como cap, 5' e 3' UTRs, poli A e ORF, e maior comprimento em relação ao não replicante (Fig. 2b). Sua estrutura é mais comumente baseada no genoma do alfavírus, a partir do qual os genes da proteína estrutural foram substituídos pelo antígeno de escolha, mas os genes que codificam a maquinaria de replicação de RNA estão intactos. Os genes de replicação contidos no saRNA contém promotor, região que inicia a transcrição, e uma grande ORF que codifica proteínas não estruturais. A transcrição inicial ocorre no núcleo celular produzindo uma cópia de sentido negativo do genoma que serve como um modelo para duas moléculas de RNA de fita positiva: o mRNA genômico e um mRNA subgenômico mais curto (BRITO *et al.*, 2015; FULLER; BERGLUND, 2020; WANG *et al.*, 2021). Este mRNA subgenômico desloca-se para o citoplasma e é transcrito em níveis muito elevados, permitindo a amplificação do mRNA e tradução em altos níveis dos antígenos codificados à partir de doses relativamente baixas da vacina.

Figura 2 - Mecanismos de ação do mRNA vacinal na célula.



Legenda: Representação esquemática da interação mRNA vacinal com célula. (a) mRNA não replicante entra em contato com a superfície celular, é reconhecido e endocitado. Escapa para o citosol sendo reconhecido pelo ribossomo, dando início à tradução proteica com síntese das proteínas pré-determinadas *in vitro* durante a confecção do mRNA. (b) mRNA auto-amplificante possui os mesmos mecanismos de interação que o mRNA não replicante, porém ao escapar para o citosol sua subunidade de replicação é reconhecida pela RNA-polimerase e novas fitas idênticas de mRNA são produzidas. Estes novos mRNA traduzidos, gerando um número muito maior de proteínas-alvo.

Fonte: Autoria própria, criado com BioRender.com.

3. SISTEMAS DE ENTREGA DAS VACINAS DE mRNA NO ORGANISMO

Para atuar como uma vacina, o mRNA exógeno deve entrar no citosol celular, onde a tradução proteica pode ocorrer, e induzir resposta imune eficaz. O plasma ou membrana lipídica endossômica representa uma barreira que a vacina de mRNA deve cruzar da forma mais eficiente possível e a indução de uma resposta imune eficaz requer a estimulação do sistema imune inato pela vacina de mRNA. Devido à instabilidade dos mRNAs e fácil degradação, estas vacinas lançam mão de algumas estratégias de entrega, como a entrega nua ou associada a carreadores/portadores. Neste sentido, várias tecnologias vêm sendo desenvolvidas para aumentar a entrega às células e potencializar os adjuvantes das vacinas de mRNA.

A imunização pode ocorrer por meio de mRNA nu, sem nenhum portador, através da aplicação de injeção direta em vias que levam rumo às Células Apresentadoras de Antígeno (APCs), como a administração intradérmica e intranodal (PARDI *et al*, 2018). Como esperado, os mRNAs nus não conseguem cruzar a

membrana livremente, então foram criadas algumas hipóteses sobre sua forma de captação. Algumas teorias indicam que mRNAs são entregues dentro das células de maneira natural por ruptura da membrana na hora da aplicação ou são captados por macropinositose realizada por Células Dendríticas (DCs). Já as formas artificiais de penetração direta nas células acontecem por microinjeção, ruptura mecânica e térmica da membrana, eletroporação, ruptura bioquímica da membrana e canais/válvulas bloqueados (RAUCH *et al.*, 2018). Em relação às desvantagens da utilização deste método, se destaca a instabilidade e fácil degradação do mRNA, porém já é possível mudar a forma de administração para aplicação direta e modificar a estrutura química de forma apropriada. O mRNA nu também apresenta vantagens, pois ao entrar na célula sem nenhuma barreira ele pode combinar-se diretamente aos ribossomos no citosol e iniciar a tradução, garantindo maior rapidez na expressão da proteína e montagem da resposta imune no organismo (RAUCH *et al.*, 2018; FOK; MAYER, 2020; WANG *et al.*, 2021).

A entrega de mRNA também pode ocorrer utilizando um portador, sendo que os baseados em peptídeos fornecem forte expressão antigênica e imunoestimulação, como por exemplo o mRNA complexado com protamina. A protamina é uma das pequenas proteínas nucleares catiônicas ricas em arginina que estabiliza ácidos nucleicos. Este peptídeo catiônico interage eletrostaticamente com o mRNA carregado negativamente, facilitando a entrega da vacina na célula. As protaminas devido às combinações excessivamente fortes com os mRNAs podem protegê-los da degradação mediada por RNase no soro. Além disso, a protamina é um adjuvante, capaz de aumentar a resposta imune, tornando-a precoce, duradoura e elevada (JARZEBSKA *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2021).

Portadores baseados em nanopartículas lipídicas (LNPs) catiônicas potencializam a eficácia e a entrega *in vivo* das vacinas de mRNA. Eles aumentam a absorção pelas células e melhoram a entrega à maquinaria de tradução no citoplasma. Seu uso leva à expansão do campo de uso de vacinas profiláticas e ao desenvolvimento de vacinas de mRNA mais potentes e versáteis. A maioria dos LNPs complexados com mRNA carregado negativamente dependem de componentes estruturais que aumentam sua estabilidade e eficácia, como amino-lipídeos ionizáveis, fosfolipídios, colesterol e polietilenoglicol (PEG) ancorado em lipídios (PEG) LUTZ *et al.*, 2017;

MAUGERI *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2021). Os amino-lipídeos ionizáveis promovem o escape do mRNA dos compartimentos endossômicos para o citoplasma. O colesterol e fosfolipídios atuam como elementos estabilizadores da estrutura do LNP e desempenham um papel importante na transfecção das células. O PEG ancorado em lipídios se deposita preferencialmente na superfície do LNP, onde pode atuar como uma barreira que estabiliza o LNP e reduz a ligação não específica à proteínas. Além desses componentes, a superfície de um LNP pode conter estruturas que atuam no direcionamento específico da vacina para certos tecidos ou células, modificações na cabeça e na cauda dos lipídios e/ou adição de isocianetos, aumentando a eficácia de entrega e facilitando assim a absorção do mRNA vacinal, levando a uma resposta imune aumentada contra o antígeno de escolha e protegendo da degradação por enzimas (HEARTLEIN *et al.*, 2016; MAUGERI *et al.*, 2019).

Além dos peptídeos catiônicos, a entrega pode ser baseada em polímeros contendo peptídeos aniônicos conjugados à substâncias carregadas positivamente. Os materiais poliméricos são os menos investigados, mas já sabe-se que eles revestem o mRNA sem sofrer degradação e promovem a expressão de proteínas. Entretanto, sofrem a polidispersidade e a depuração de moléculas grandes e por isso, para melhorar o efeito terapêutico são adicionadas cadeias lipídicas.

Os polímeros subdividem-se em polímeros catiônicos e polímeros aniônicos. Os polímeros catiônicos possuem três membros: a polietilenimina (PEI), o dendrímero de poliamidoamina (PAMAM) e o polissacarídeo (MARUGGI *et al.*, 2019). A utilização do PEI como veículo ajuda na proteção do saRNA à RNase, na absorção pelas DCs, facilita a tradução do mRNA e induz respostas humorais e celulares, porém não é uma estrutura biodegradável (HEARTLEIN *et al.*, 2016). O PAMAM é um vetor de entrega potencial porque tem vários grupos funcionais com alta tolerabilidade. Já o exemplar do polissacarídeo é a quitosana, uma substância envolvida no favorecimento da passagem do RNA nu pela membrana celular e à sobrevivência na condição biológica (WANG *et al.*, 2021). Os polímeros aniônicos também são usados como portadores ao serem conjugados com lipídios catiônicos em um complexo de PGLA, o que ajuda a estabelecer um sistema eficiente de encapsulamento de RNA (YASAR *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2021).

Outra importante estratégia de entrega de saRNA é a mimetização de infecção por vírus. São construídas partículas de replicação semelhantes a vírus (VRPs), mostrando-se promissoras para aumento da potência da vacina. O processo de montagem inicia com a sintetização *in vitro* das proteínas estruturais virais e é seguido pelo encapsulamento de saRNA codificador de antígeno. Existem limitações, como produção em grande escala que ainda não foi realizada e a possibilidade do complexo vacinal promover a produção de anticorpos anti-vetor, mostrando que é necessário diminuir a imunogenicidade das VRPs (WANG *et al.*, 2021; BIDDLECOME *et al.*, 2019).

As Células Dendríticas (CDs) são APCs e suas funções são internalizar, processar e apresentar antígenos, gerando resposta imune eficaz e específica. Essa resposta é gerada através da apresentação de peptídeos no complexo de histocompatibilidade principal (MHC-I e MHC-II), sinalização por coestimuladores que fornecem sinais secundários, e citocinas e quimiocinas que induzem diferenciação, proliferação e recrutamento de células T auxiliares e citotóxicas. Esses processos conduzem à montagem de resposta imune robusta e completa. Por isso, é a célula alvo ideal para a vacina de mRNA. O mRNA pode formar complexo com as CDs tanto *ex vivo* quanto *in situ*. Para a montagem do complexo *ex vivo*, as DCs imaturas são obtidas do sangue periférico dos pacientes e são induzidas a maturação. As DCs quando maduras são transfectadas com o mRNA que codifica o antígeno. Em seguida, as vacinas com complexo DC-mRNA são administradas nos pacientes. Para a condição *in situ*, a transfecção de DC pode ser realizada pela injeção direta de mRNAs nu como já discutido neste capítulo (BENTEYN *et al.*, 2015; VAN LINT *et al.*, 2015).

4. ATUAÇÃO DAS VACINAS DE mRNA

As vacinas têm como objetivo promover a proteção de longo termo contra patógenos através da ativação do sistema imune adaptativo, levando a produção de anticorpos neutralizantes e indução de células de memória. Isso acontece pela indução da produção de células efetoras ou moléculas que são capazes de neutralizar os

patógenos pelo controle de sua replicação ou inativação de seus componentes tóxicos (FOK; MAYER, 2020).

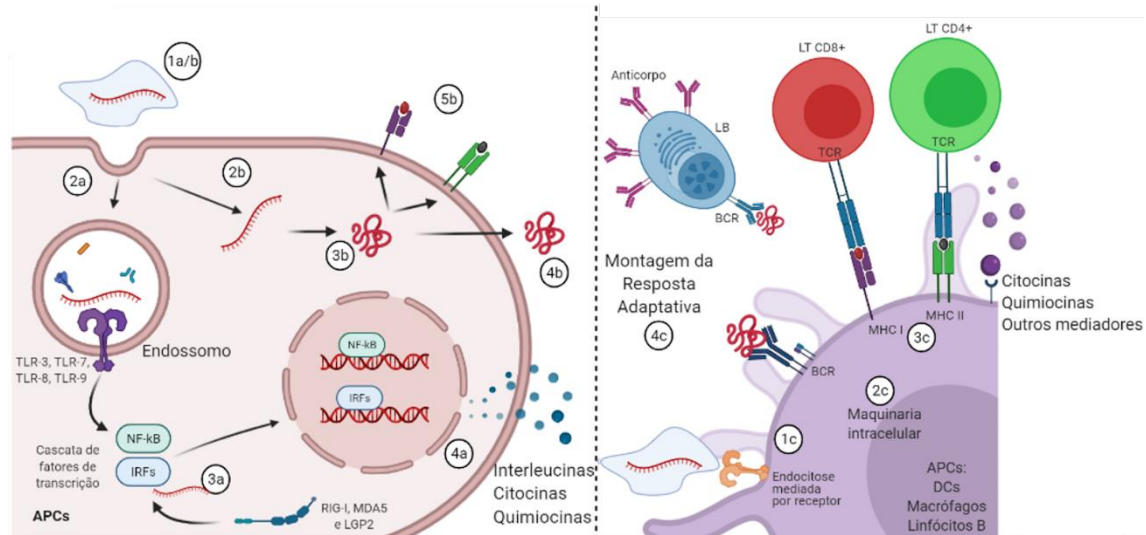
Vale lembrar que a via de administração e a formulação de vacinas de mRNA são cruciais para determinar a magnitude da expressão do antígeno, assim como a potência e qualidade da resposta imune gerada por ela (HARDT *et al.*, 2016). Normalmente, a inoculação do mRNA na forma de vacina pode ser feita por várias vias, como intramuscular, subcutânea, intravenosa, intradermal, intranodal e intra esplênica, exibindo assim uma versatilidade na imunização contra doenças infecciosas e não infecciosas (BORAH *et al.*, 2016).

Independente da via de administração, o mecanismo de ação dessas vacinas segue um mesmo princípio geral (Fig. 3). O mRNA de interesse é administrado na forma de vacina, sendo internalizado por células alvo, especialmente células apresentadoras de antígenos, por vias dependentes da formulação de entrega empregada, como abordado anteriormente. Em células alvo, as vacinas de mRNA atuam duplamente, codificando os antígenos de interesse, que serão processados e apresentados em moléculas de MHC, e fornecendo sinais adjuvantes, diretamente pelo reconhecimento destas moléculas por sensores da imunidade inata e que culminam com expressão de moléculas coestimuladoras e produção de citocinas e quimiocinas. Nestas células encontram-se receptores do tipo Toll Like (TLRs) e receptores da família RIG-I. O primeiro conjunto é dividido em TLR-3, TLR-7, TLR-8 e TLR-9. Dessas, TLR-3 identificam RNA fita dupla, TLR-8 reconhece RNA fita simples e TLR-7 ambos tipos de RNA (ZHANG *et al.*, 2019). Já os receptores RIG-like incluem RIG-I, MDA5 e LGP2. RIG-I reconhece RNA fita simples e RNA fita dupla iniciados em trifosfato 5'; o outro receptor, MDA5, detecta fitas longas de RNA formadas durante a replicação viral e também RNA de origem sintética (RAUCH *et al.*, 2018; MARUGGI *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019).

O contato do mRNA com esses receptores promove a ativação das células, através da fosforilação de fatores de transcrição e estimula a produção de citocinas como Interleucinas, Interferon e Fator de Necrose Tumoral no local. Esses compostos são cruciais para indução da resposta imune contra o antígeno codificado, contribuindo para o recrutamento de mais células imunes para o local. Dessa forma, a

resposta imunológica desejada é gerada (HARDT *et al.*, 2016; MARUGGI *et al.*, 2019; BORAH *et al.*, 2021).

Figura 3 - Interação da vacina de mRNA com a célula.



Legenda: Interação da vacina de mRNA com a célula. O mRNA vacinal de interesse é injetado e reconhecido por células da periferia e transportados para os linfonodos por DCs (1). O mRNA codifica a proteína alvo, que é processada e expressa em MHC e/ou exportada/expresa (2). Tanto as DCs, quanto as outras APCs possuem sensores inatos de reconhecimento do mRNA, gerando sinais pró-inflamatórios, e maquinaria de processamento e apresentação em moléculas de MHC e também expressão/exportação da proteína (3). O conjunto de sinais gerados pela propriedade adjuvante do mRNA e a apresentação de peptídeos gerados pela proteína codificada induzem as respostas celulares e humorais (4). Diferentes vias de processamento permitem apresentação em HMC de classe I e II (5). Vias intracelulares complexas de processamento e sinalização foram simplificadas neste esquema, preservando apenas seus desfechos gerais. **Fonte:** Autoria própria, criado com BioRender.com.

5. VACINAS DE mRNA EM DESENVOLVIMENTO E SUAS APLICAÇÕES

No ano de 2019, surgiu o primeiro caso da COVID-19 (Corona Virus Disease-2019), causada pelo SARS-CoV-2. Desde então, várias pesquisas de desenvolvimento de vacinas foram conduzidas. As vacinas de mRNA contra SARS-CoV-2 codificam antígenos da proteína S (do inglês “*Spike*”), os estudos *in vitro* e *in vivo* já demonstraram que codifica o antígeno de forma eficaz e significativa.

As vacinas de mRNA, quando comparadas com outros tipos de vacinas, foram definidas como mais promissoras contra SARS-CoV-2, pois elas precisam de

sequências de genes virais, em vez de cepas de vírus. A produção de vacinas de mRNA dispensa o uso de cultura de células ou matriz animal, o que significa que o processo de produção é mais simples e o custo é menor. Os mRNAs são um componente comum das células humanas, podendo ser degradados naturalmente sem toxicidade metabólica (PARDI *et al.*, 2018).

A primeira vacina contra SARS-CoV-2 a entrar em ensaios clínicos de fase 1 foi a mRNA-1273 encapsulado em nanopartícula de lipídio (LNP) desenvolvido pela Moderna e o Centro de Pesquisa de Vacinas do Instituto Nacional de Saúde. Ela é composta por mRNA encapsulada de LNP que expressa a glicoproteína S estabilizada por pré-fusão. O estudo de fase 3 feito em 99 centros nos Estados Unidos, demonstrou que dos 30.420 voluntários com alto risco de infecção por SARS-CoV-2 ou complicações, 185 participantes do grupo placebo tiveram a doença sintomática em comparação com 11 participantes que receberam a vacina, mostrando uma eficácia de 94,1% (BLOOM; VAN DEN BERG; ARBUTHNOT, 2020; POLACK *et al.*, 2020).

Outra vacina, BNT162b2, desenvolvida pela BioNTech e Pfizer, codifica o pico de comprimento total SARS-CoV-2, modificado por duas mutações de prolina para bloqueá-lo na conformação de pré-fusão e imitar mais de perto o vírus intacto com o qual os anticorpos neutralizantes de vírus devem interagir. Um estudo randomizado obteve 43.448 voluntários, dos quais 21.720 foram vacinados com BNT162b2 e 21.728 com placebo. Houve 8 casos de Covid-19 após a segunda dose entre os participantes que receberam a vacina de mRNA BNT162b2 e 162 casos entre aqueles que receberam o placebo, mostrando que a BNT162b2 foi 95% eficaz na prevenção de Covid-19 (WALSH *et al.*, 2020). No Brasil, a vacina BNT162b2 teve registro definitivo aprovado para uso em humanos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, tendo até o momento recebido 100 milhões do imunizante.

Na terapia contra diversos tipos de tumores as vacinas de mRNA têm sido estudadas devido sua capacidade de entrega do transcrito de interesse, codificando no citoplasma da célula, um ou mais antígenos associados a tumor ou específicos de tumor (TAAs ou TSAs) (MCNAMARA; NAIR; HOLL, 2015). Também existe a possibilidade de introduzir de forma intratumoral um mRNA que codifica um elemento da imunidade ao invés de TAAs (MCNAMARA; NAIR; HOLL, 2015; PARDI *et al.*, 2018). Com base nas características conhecidas das DCs, a vacina

baseada em mRNA transfectada em DCs, *in vivo* ou *ex vivo*, foram as primeiras a iniciarem estudos clínicos para entregar mRNA na bioterapia do câncer, desencadeando respostas imunes específicas do antígeno (PARDI *et al.*, 2018). Diferentes métodos de entrega são aplicados, porém a injeção direta de mRNA não tem se mostrado um método eficiente, principalmente a entrega intranodal, que facilita a entrega de antígenos para APCs (MCNAMARA; NAIR; HOLL, 2015; PARDI *et al.*, 2018).

Os parasitos causam infecções parasitárias podendo ser graves e os tratamentos existentes não são 100% seguros e eficazes. Não há uma vacina contra esses parasitos, especialmente devido à complexidade biológica dos mesmos. Esta complexidade é devido aos grandes genomas e grande variedade de proteínas funcionais, ciclos de vida complexos, estratégias de escape e modulação do sistema imunológico do hospedeiro (PARDI *et al.*, 2018). Esses desafios tornam as plataformas de vacinas convencionais não eficazes e a escolha de alvos para novas plataformas é desafiadora, embora promissora.

Em uma vacina de mRNA pode ser expresso mais um tipo de proteína simultaneamente, as respostas imunes celulares induzidas são mais fortes, assim como há um maior perfil de segurança. Já estão sendo desenvolvidas algumas vacinas de mRNA contra alguns patógenos. O *Toxoplasma gondii* é um parasito que o sistema imune é capaz de controlar de forma eficiente, mas em indivíduos imunossuprimidos pode acarretar em uma doença devastadora. Em 2019, pesquisadores prospectaram *in silico* uma proteína imunogênica a partir de três epítopos antigênicos, com alta probabilidade de ser uma candidata a vacina de mRNA (MU; HAYNES; CAIN, 2021). Chahal *et al.* (2016) construíram uma vacina baseada nas proteínas replicase do vírus da encefalite equina venezuelana, de mRNA autoamplificantes codificadas para seis diferentes antígenos de *T. gondii*. Trinta e dois dias após uma única vacinação, os camundongos foram infectados com uma dose letal de *T. gondii* tipo II, e todos os camundongos vacinados sobreviveram ao desafio letal, enquanto os camundongos do grupo de controle morreram em 12 dias (ESTEBAN *et al.*, 2021).

O *Plasmodium spp.* é agente causador da malária, doença caracterizada pela invasão dos protozoários em hemácias. Foi demonstrado que a proteína circunsporozoíta (PfCSP), antígeno de escolha da vacina de mRNA, tem potencial

imunogênico e protetor contra a malária. PfCSP mRNA-LNP alcançou proteção estéril contra duas cepas de *P. berghei* PfCSP transgênico, tornando-a uma candidata atraente para maiores investigações (VERSTEEG *et al.*, 2019).

Em infecções virais na fase aguda há muitos vírus dentro do organismo. Caso o sistema imune não consiga eliminar o vírus, pode haver a cronificação da doença. Ambas as fases são de importância sanitária, pois ocorre a eliminação viral. Por isso, há a necessidade de encontrar vacinas para a profilaxia e imunoterapia das infecções, e os métodos de vacinação com ácido nucleico apresentam grande potencial.

O vírus da Hepatite C (HCV) na maioria dos casos se cronificam, portanto a vacina de mRNA deve induzir não apenas imunidade humoral, mas também celular com efeito antiviral direto. As vacinas de HCV têm sido usadas para reativar as células T específicas do vírus que perderam sua função devido à infecção ou induzir uma resposta imune não pré-existente. As vacinas de mRNA, em geral, têm a função de incentivar o sistema imune a produzir substâncias antivirais (DODANGEH *et al.*, 2019).

Os esforços atuais de vacinas contra o HIV têm se concentrado principalmente na entrega do mRNA por DCs e do mRNA nu. Estudos indicam a segurança da intervenção, porém ainda não há resultados favoráveis quanto ao combate contra o vírus. As atenções estão voltadas para a necessidade da melhora da eficácia da vacina, envolvendo o desenvolvimento de novos imunógenos, encontrar novas combinações de moléculas adjuvantes que podem ser incluídas na sequência de RNA ou na formulação da vacina, principalmente em encontrar o equilíbrio entre a atividade imunostimulante e a produção de proteínas, para que não ocorra a superestimulação. Além da vacina de mRNA, estudos também analisam a eficácia combinada das vacinas com outros tratamentos antirretrovirais (CHAHAL *et al.*, 2016; MALLORY *et al.*, 2021).

Considerando estes conceitos e a urgência do desenvolvimento de imunizantes imposta pela pandemia da COVID-19 fica claro que as bases que culminaram com o desenvolvimento destas vacinas serão alicerces para o aprimoramento tecnológico e desenvolvimento de estratégias similares para outras doenças, como tumores e outras doenças infecciosas.

REFERÊNCIAS

- BENTEYN, D. *et al.* mRNA-based dendritic cell vaccines. *Expert review of vaccines*, v. 14, n. 2, p. 161-176, 2015. DOI: 10.1586/14760584.2014.957684
- BIDDLECOME, A. *et al.* Delivery of self-amplifying RNA vaccines in in vitro reconstituted virus-like particles. *PloS one*, v. 14, n. 6, p. e0215031, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0215031
- BLOOM, K.; VAN DEN BERG, F.; ARBUTHNOT, P. Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases. *Gene Therapy*, p. 1-13, 2020. DOI: 10.1038/s41434-020-00204-y
- BORAH, P. *et al.* Perspectives on RNA Vaccine Candidates for COVID-19. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 8, p. 30, 2021. DOI: 10.3389/fmolb.2021.635245
- BRITO, L. A. *et al.* Self-amplifying mRNA vaccines. *Advances in genetics*, v. 89, p. 179-233, 2015. DOI: 10.1016/bs.adgen.2014.10.005
- CHAHAL, J. S. *et al.* Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H1N1 influenza, and *Toxoplasma gondii* challenges with a single dose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 113, n. 29, p. E4133-E4142, 2016. DOI:10.1073/pnas.1600299113
- CRICK, F. H. C. On the genetic code. *Science*, v. 139, n. 3554, p. 461-464, 1963. DOI: 10.1126/science.139.3554.461
- DAI, X.; ZHANG, S.; ZALETA-RIVERA, K. RNA: interactions drive functionalities. *Molecular biology reports*, v. 47, n. 2, p. 1413-1434, 2020. DOI: 10.1007/s11033-019-05230-7
- DODANGEH, S. *et al.* In silico analysis and expression of a novel chimeric antigen as a vaccine candidate against *Toxoplasma gondii*. *Microbial pathogenesis*, v. 132, p. 275-281, 2019. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.05.013
- ESTEBAN, I. *et al.* In the Era of mRNA Vaccines, Is There Any Hope for HIV Functional Cure? *Viruses*, v. 13, n. 3, p. 501, 2021. DOI: 10.3390/v13030501
- FOK, J.; MAYER, C. Genetic code expansion strategies for vaccine development. *Combining Chemistry and Biology*, v. 21, n. 23, p. 3291-3300, 2020. DOI: 10.1002/cbic.202000343
- FULLER, D. H.; BERGLUND, P. Amplifying RNA vaccine development. *New England Journal of Medicine*, v. 382, n. 25, p. 2469-2471, 2020. DOI: 10.1056/NEJMcibr2009737
- GALLOWAY, A.; COWLING, V. H. mRNA cap regulation in mammalian cell function and fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, v. 1862, n. 3, p. 270-279, 2019. DOI: 10.1016/j.bbagr.2018.09.011
- HARDT, K. *et al.* Vaccine strategies: Optimising outcomes, *Vaccine*, v. 34, n. 52, p. 6691-6699, 2016. DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.10.078
- HEARTLEIN, M. W. *et al.* Polymer-Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of mRNA to the Lungs. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 55, n. 44, p. 13808-13812, 2016. DOI: 10.1002/anie.201608450
- IBBA, M.; SÖLL, D. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annual review of biochemistry*, v. 69, n. 1, p. 617-650, 2000. DOI: 10.1146/annurev.biochem.69.1.617

- JARZEBSKA, N. T. *et al.* Functional differences between protamine preparations for the transfection of mRNA. *Drug Delivery*, v. 27, n. 1, p. 1231-1235, 2020. DOI: 10.1080/10717544.2020.1790692
- KAPRANOV, P.; WILLINGHAM, A. T.; GINGERAS, T. R. Genome-wide transcription and the implications for genomic organization. *Nature Reviews Genetics*, v. 8, n. 6, p. 413-423, 2007. DOI: 10.1038/nrg2083
- LEE, Y.; RIO, D. C. Mechanisms and regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Annual review of biochemistry*, v. 84, p. 291-323, 2015. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060614-034316
- LUTZ, J. *et al.* Unmodified mRNA in LNPs constitutes a competitive technology for prophylactic vaccines. *npj Vaccines*, v.2, 2017. DOI:10.1038/s41541-017-0032-6
- MALLORY, K. L. *et al.* Messenger RNA expressing PfCSP induces functional, protective immune responses against malaria in mice. *npj Vaccines*, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2021. DOI: 10.1038/s41541-021-00345-0
- MARUGGI, G. *et al.* mRNA as a transformative technology for vaccine development to control infectious diseases. *Molecular Therapy*, v. 27, n. 4, p. 757-772, 2019. DOI: 10.1016/j.ymthe.2019.01.020
- MAUGERI, M. *et al.* Linkage between endosomal escape of LNP-mRNA and loading into EVs for transport to other cells. *Nature communications*, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2019. DOI:10.1038/s41467-019-12275-6
- MCNAMARA, M. A.; NAIR, S. K.; HOLL, E. K. RNA-based vaccines in cancer immunotherapy. *Journal of immunology research*, v. 2015, 2015. DOI: 10.1155/2015/794528
- MERRICK, W. C. Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiological reviews*, v. 56, n. 2, p. 291-315, 1992. DOI: 10.1128/mr.56.2.291-315.1992
- MIKKOLA, S. Nucleotide sugars in chemistry and biology. *Molecules*, v. 25, n. 23, p. 5755, 2020. DOI: 10.3390/molecules25235755
- MU, Z.; HAYNES, B. F.; CAIN, D. W. HIV mRNA Vaccines—Progress and Future Paths. *Vaccines*, v. 9, n. 2, p. 134, 2021. DOI: 10.3390/vaccines9020134
- O'DONOGHUE, P.; LING, J.; SÖLL, D. Transfer RNA function and evolution. *RNA Biology*, v. 15, n. 4-5, p. 423-426, 2018. DOI: 10.1080/15476286.2018.1478942
- PARDI, N. *et al.* mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov*, v. 14, p. 261-279, 2018. DOI: 10.1038/nrd.2017.243
- PERSSON, P. B.; MUELLER, M. Transcription. *Acta Physiologica*, v. 215, n. 4, p. 159-160, 2015. DOI: 10.1111/apha.12597
- PLOTKIN, S. History of vaccination. *PNAS*, v. 111, n. 34, p. 12283-12287, 2014.
- PLOTKIN, S.A.; PLOTKIN, S. L. The development of vaccines: how the past led to the future. *Nat. Rev. Microbiol*, v. 9, p. 889-893, 2011. DOI: 10.1073/pnas.1400472111
- POLACK, F. P. *et al.* Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *New England Journal of Medicine*, 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa2034577

- RAMANATHAN, A.; ROBB, G. B.; CHAN, S. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic acids research*, v. 44, n. 16, p. 7511-7526, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkw551
- RAUCH, S. *et al.* New vaccine technologie to combat outbreak situations. *Front. Immunol*, v. 9, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01963
- RICH, A. Why RNA and DNA have different structures. *RNA Towards Medicine*, p. 1-8, 2006. DOI: 10.1007/3-540-27262-3_1
- RICHARD, P.; VETHANTHAM, V.; MANLEY, J. L. Roles of sumoylation in mRNA processing and metabolism. *SUMO Regulation of Cellular Processes*, p. 15-33, 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-50044-7_2
- SMELLIE, R. M. S. Biochemistry of deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid replication. *British medical bulletin*, v. 21, n. 3, p. 195-202, 1965. DOI: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a070395
- STEWART, M. Polyadenylation and nuclear export of mRNAs. *Journal of Biological Chemistry*, v. 294, n. 9, p. 2977-2987, 2019. DOI: 10.1074/jbc.REV118.005594
- SUZUKI, T. The expanding world of tRNA modifications and their disease relevance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 22, n. 6, p. 375-392, 2021. DOI:10.1038/s41580-021-00342-0
- TAKADA, H. *et al.* Differential Regulation of rRNA and tRNA Transcription from the rRNA-tRNA Composite Operon in *Escherichia coli*. *PloS one*, v. 11, n. 12, p. e0163057, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0163057
- TIAN, B.; MANLEY, J. L. Alternative polyadenylation of mRNA precursors. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 18, n. 1, p. 18-30, 2017. DOI: 10.1038/nrm.2016.116
- VAISMAN, A.; WOODGATE, R. Ribonucleotide discrimination by translesion synthesis DNA polymerases. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, v. 53, n. 4, p. 382-402, 2018. DOI: 10.1080/10409238.2018.1483889
- VAN LINT, S. *et al.* The ReNAissanCe of mRNA-based cancer therapy. *Expert review of vaccines*, v. 14, n. 2, p. 235-251, 2015. DOI: 10.1586/14760584.2015.957685
- VERSTEEG, L. *et al.* Enlisting the mRNA vaccine platform to combat parasitic infections. *Vaccines*, v. 7, n. 4, p. 122, 2019. DOI: 10.3390/vaccines7040122
- WALSH, E. E. *et al.* RNA-based COVID-19 vaccine BNT162b2 selected for a pivotal efficacy study. *Medrxiv*, 2020. DOI: 10.1101/2020.08.17.20176651
- WANG, Y. *et al.* mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy. *Molecular Cancer*, v. 20, n. 1, p. 1-23, 2021. DOI: 10.1186/s12943-021-01311-z
- YASAR, H. *et al.* Kinetics of mRNA delivery and protein translation in dendritic cells using lipid-coated PLGA nanoparticles. *Journal of nanobiotechnology*, v. 16, n. 1, p. 1-19, 2018.
- ZAHID, M. *et al.* DNA nanotechnology: a future perspective. *Nanoscale research letters*, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2013. DOI: 10.1186/1556-276X-8-119
- ZHANG, C. *et al.* Advances in mRNA vaccines for infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 594, 2019.

CAPÍTULO 05

**Vacinação Reversa E Identificação De Alvos Vacinais Por
Bioinformática**

Andrei Giacchetto Felice¹; Arun Kumar Jaiswal²; Felipe Lucas Zen³;
Ligia Carolina da Silva Prado²; Michele Min San Wu³;
Pedro Henrique Marques³; Rafael Destro Rosa Tiveron¹;
Rafael Obata Trevisan⁴; Wylerson Guimarães Nogueira⁵;
Yngrid Victória Cassiano Mascarenhas³; Carlo José Freire Oliveira⁶;
Vasco Ariston de Carvalho Azevedo⁷; Siomar de Castro Soares⁶

¹ Mestrando em Ciências, ênfase em Parasitologia e Imunologia Aplicadas. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia – UFTM

² Pós – Doutorando em Bioinformática. Programa Interunidades de Pós – Graduação em Bioinformática – UFMG

³ Graduando do curso de Biomedicina. Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM

⁴ Doutorando em Ciências, ênfase em Parasitologia e Imunologia Aplicadas. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia – UFTM

⁵ Doutorando em Bioinformática. Programa Interunidades de Pós – Graduação em Bioinformática – UFMG

⁶ Professor Adjunto do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM

⁷ Professor Titular do Departamento de Genética, Ecologia e Evolução - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

RESUMO

Desde o milênio passado há registros de cientistas que executaram, em modelos animais ou em humanos, pesquisas na tentativa de encontrar vacinas para prevenir doenças veterinárias e humanas. Essas pesquisas, como foi o caso emblemático da vacina para a Varíola, foram feitas inicialmente através da inoculação do vírus vivo num determinado hospedeiro, que após o segundo contato a esse mesmo agente agressor, esse hospedeiro desenvolveria os sintomas da infecção, mas de uma forma mais branda, o que caracterizava resistência à doença. Com o passar do tempo, resultados positivos das vacinas contra diferentes patógenos e o advento de novas tecnologias, as vacinas foram consideradas um dos principais métodos de prevenção de doenças até hoje descrito. Em termos práticos, com o passar dos anos e com o aperfeiçoamento das formas com que as vacinas foram sendo produzidas mais e mais doenças foram erradicadas. As mudanças e os avanços foram tão robustos ao longo dos séculos que essas tecnologias possibilitaram a divisão das vacinas em diversas gerações, que passavam desde vacinas com o microrganismo inteiro (1ª geração) até a descoberta da vacinação reversa, uma técnica bastante recente que revolucionou todo o processo e possibilitou a identificação de subunidades dos patógenos para serem utilizadas como antígenos na produção das vacinas, o que tornou esse processo mais barato, mais seguro e mais rápido. Nesse capítulo abordaremos sobre a história das vacinas e apresentaremos a tecnologia que definiu a vacinação reversa e seu potencial para a geração de vacinas para uma diversidade de agentes agressores.

Palavras-chave: Vacina. Genômica. Pangenômica. Vacinação Reversa.

1. VACINOLOGIA CLÁSSICA

1.1. *Conceito*

O conceito de vaciniologia se aplica ao estudo dos mecanismos de desenvolvimento de imunógenos com o objetivo de estabelecer vacinas para a prevenção e tratamento de doenças infecciosas, tumorais, alérgicas e autoimunes.

1.2. *Histórico*

A descoberta da vacina se deu em 1796 pelo observador e médico inglês Edward Jenner (Figura 1), onde seu desenvolvimento se deu a partir de outra doença, a cowpox (estilo de varíola que acometia as vacas). Jenner percebeu que as pessoas que ordenhavam as vacas adquiriram imunidade à varíola humana. Com o passar dos estudos, Jenner pôde comprovar que ao inocular uma secreção de alguém com a doença em outra pessoa saudável, esta desenvolveu sintomas mais brandos e tornou-se imune à patologia em si, ou seja, ficava protegida. A palavra vacina derivou-se de *Variolae vaccinae*, nome científico dado à varíola bovina, e passou a designar todo o inóculo que tem capacidade de produzir anticorpos (FIOCRUZ, 2016; MCNALLY, 2001).

Figura 1: Edward Jenner: O pai da vacina (1749-1823)



Em 14 de maio de 1796, Jenner inoculou James Phipps, um menino de 8 anos, com pus retirado de uma pústula de Sarah Nelmes, uma ordenhadora que sofria de cowpox. O paciente contraiu a infecção benigna e, após 10 dias, estava recuperado da mesma. Meses depois, Jenner inoculou Phipps com pus varioloso, o resultado foi o não adoecimento do menino, levando assim à descoberta da vacina (Figura 2).

Fonte da imagem: <http://mortenahistoria.blogspot.com/2014/01/morte-de-edward-jenner.html>

Figura 2: Experimento de Edward Jenner, eternizado nesta estátua vacinando o próprio filho.



A partir de então, Jenner começou a imunizar crianças com material retirado diretamente das pústulas dos animais e passado braço a braço. Em 1798, divulgava sua descoberta no trabalho: *Um Inquérito sobre as Causas e os Efeitos da Vacina da Varíola*. Em 1804, o Marquês de Barbacena conduz o transporte da vacina para o Brasil de um jeito a fazer jus ao método de Jenner. Os escravos do Marquês de Barbacena “vacinavam-se” através de cortes e exposições propositalmente às lesões dos doentes, assim atingindo em

massa a vacinação. Já em 1807, Baviera decretou a vacinação contra a varíola obrigatória por lei. Seguido por Dinamarca, Suécia e outros países germânicos.

Imagem:https://www.em.com.br/app/noticia/internacional/bbc/2020/10/05/interna_internacional,1191700/como-um-experimento-com-vacas-resultou-no-nascimento-da-primeira-vacin.shtml

Em 1885, o cientista francês e fundador da moderna microbiologia e da medicina experimental, Louis Pasteur (Figura 3), comunicou a Academia de Ciências a descoberta do imunizante contra a raiva seguindo uma metodologia científica. Pasteur revolucionou a ciência ao desenvolver um imunizante produzido à vontade por um método que podia ser generalizado.

Figura 3: Louis Pasteur, pioneiro no uso de vacinas microbiológicas produzidas em laboratório.



Fonte da Imagem:<https://animalbusiness.com.br/medicina-veterinaria/ciencia-e-saude/a-celebre-experiencia-daprimeira-vacina-de-pasteur-na-franca/>

Em 1904, o sanitarista Oswaldo Cruz convence o Congresso a instaurar a lei que torna obrigatória a vacinação. Essa ação desencadeou uma insatisfação populacional com a campanha de vacinação obrigatória contra a varíola, decorrendo em um marco histórico: a revolta da vacina. Em 1909, Albert Calmette e Camille Guérin, do Instituto Pasteur, comunicavam à Academia de Ciências Francesa o desenvolvimento de um bacilo de virulência atenuada, proveniente de sucessivas culturas em bile de boi, com capacidade imunizante contra a tuberculose. Era o BCG (bacilo de Calmette & Guérin), que, após uma série de testes, passou a ser regularmente utilizado como vacina (DAIANE HARTWIG, [S.d.]; MINISTÉRIO DA SAÚDE, [S.d.]). Já em 1936, houve a criação da cepa 17D da febre amarela (flavivírus), onde o médico sul-africano Max Theiler concluiu o desenvolvimento de uma vacina contra a febre amarela, com uma versão atenuada do vírus já reconhecido como agente causador da doença. No ano subsequente, a vacina foi testada no Brasil.

Em 1942, a Vacina DPT ou vacina tríplice bacteriana, como é conhecida atualmente, contra difteria (*Corynebacterium diphtheriae*), coqueluche (*Bordetella pertussis*) e tétano (*Clostridium tetani*) foi a primeira vacina a imunizar contra mais de um microrganismo ao mesmo tempo. Já em 1949, Jonas Salk cria uma vacina contra a poliomielite (poliovírus) a partir de vírus mortos. Foi o primeiro imunizante no mundo a ser produzido em cultura de tecidos (células de rim de macaco) e reunir mais de uma subespécie de vírus (poliovírus I, II e III). No mesmo ano, Albert Sabin criou a vacina atenuada contra a pólio, primeira aplicada via oral. Por mimetizar o mecanismo de infecção do vírus selvagem, com a excreção do microrganismo atenuado no ambiente, a vacina Sabin facilita a obtenção de altos níveis de imunidade coletiva (MINISTÉRIO DA SAÚDE, [S.d.]).

No ano de 1971, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declara a erradicação da varíola no continente americano, e em 1980, a mesma é erradicada no mundo. Marco histórico dentro da vacinologia, pois a varíola é considerada a primeira infecção prevenida e erradicada por uma vacina. No ano de 1974, a iniciativa de uma campanha de vacinação no Brasil veio por meio de uma revolta populacional que pressionou o governo atual referente a uma tomada de decisão no que tangia a epidemia de meningite meningocócica (*Neisseria meningitidis*) no país.

Na mesma linha de raciocínio, o Brasil, em 1980, criou a campanha de vacinação contra a poliomielite, que faz com que se tenha uma diminuição significativa nos casos de poliomielite no país. Ocorre também a extinção da obrigatoriedade da vacinação contra a varíola (Portaria nº55), e se dá início aos Dias Nacionais de Vacinação contra a Paralisia Infantil no Brasil. Em 1986, há a criação simbólica do Zé Gotinha, personagem da campanha pela erradicação da Poliomielite no Brasil. Nos anos de 1981 e 1986, houveram nos Estados Unidos e no mercado, a aprovação e introdução da primeira versão recombinante de vacina contra Hepatite B. Dois anos depois – 1988 – houve a criação do Sistema Único de Saúde (SUS), um dos maiores e mais complexos sistemas de saúde pública do mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, [S.d.]). No ano de 1989 houve registro do último caso de poliomielite no Brasil.

1.3. Importância Vacinal

A vacinação é cientificamente comprovada como o melhor método de erradicar doenças e conter a propagação de agentes agressores à saúde. Dito isso, seu desenvolvimento é dado em constantes estudos, objetivando sempre a melhor eficácia, segurança e método. O vacinado, como já provado pela epidemiologia, possui a possibilidade de diminuir as chances de contrair a enfermidade e aumentar a proteção dos indivíduos à sua volta. A vacinação é o motivo pelo qual diversas doenças graves e sem cura estão hoje sob controle ou foram extintas (INSTITUTO BUTANTAN, 2021).

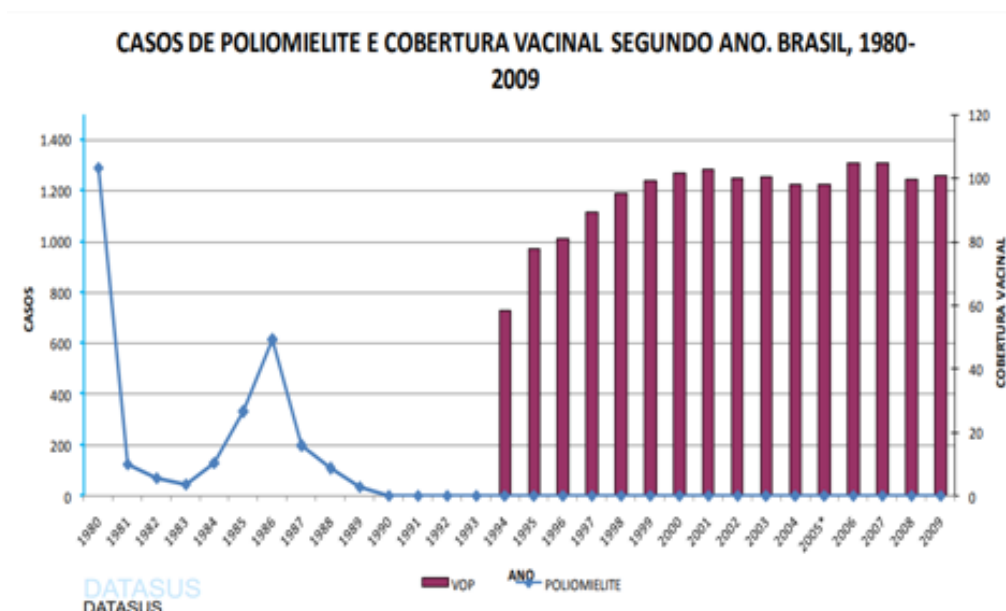
Como dito anteriormente, o caso mais emblemático foi a descoberta e desenvolvimento da primeira vacina, a vacina para a Varíola. O rápido desenvolvimento tecnológico verificado especialmente a partir da segunda metade do século XX, induziu a incorporação pelos sistemas de saúde de expressivo número de novos medicamentos, vacinas, equipamentos e procedimentos médico-cirúrgicos, com importante impacto nos padrões de morbimortalidade e na melhoria e ampliação, respectivamente, da qualidade e da expectativa de vida (HINE, 2004). O progresso da biotecnologia nas últimas décadas não só ampliou a capacidade de rápida identificação de agentes etiológicos de doenças ainda desconhecidas, mas também a de desenvolver vacinas de nova geração mais eficazes, fáceis de produzir, de menor custo e potencialmente seguras, tornando necessárias metodologias adequadas à avaliação desses novos imunobiológicos em tempo oportuno (JOSEFSBERG e BUCKLAND, 2012).

Entre as tecnologias médicas, as vacinas são as que apresentam o melhor desempenho em termos de custo-efetividade, pois permitem a prevenção e controle de doenças, mediante alocação racional dos escassos recursos disponíveis pelo setor de saúde, tornando-as componente obrigatório dos programas de saúde pública, tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento (WALDMAN e colab., 2008).

1.4. *Epidemiologia Vacinal – Poliomielite*

Sobre a epidemiologia, a vacinação é guiada por estudos e métodos epidemiológicos, tanto no conhecimento das características da doença na população, das faixas etárias mais atingidas, das formas de transmissão e das condições de risco, como na definição das melhores estratégias para o controle da doença, conforme suas características. Vejamos abaixo como exemplo, a importância vacinal através de dados epidemiológicos, casos de poliomielite antes e após a implementação do plano vacinal. Lembrando que o imunobiológico oral contra poliomielite (VOP) teve seu período de ação iniciado a partir de 1994 e que sua população alvo são indivíduos inferiores a um ano de idade (Figura 4).

Figura 4: Casos de poliomielite e cobertura vacinal segundo ano.



Legenda: O gráfico acima demonstra de forma clara a redução de casos anuais de poliomielite no Brasil após a condução VOP em crianças até o ano de 2009, assim demonstrando o impacto que a vacina possui sobre a doença e a população acometida. **Fonte:** DATASUS

1.5. Tipos De Vacina E Suas Novidades

No Brasil são muitos os tipos de vacinas disponíveis. A depender do tipo essas vacinas apresentam níveis de eficácia, segurança, disponibilidade variadas, no entanto, mesmo com as diferenças todas elas passam por importantes e robustas medidas de controle e segurança que as tornam indicadas para a população. Inicialmente, as vacinas eram construídas usando microrganismos atenuados ou inativos. Como o passar do tempo e o desenvolvimento de novas tecnologias e testes de segurança, as opções foram crescendo e se aprimorando de maneira que atualmente identificamos as vacinas como pertencentes a diferentes gerações a citar, 1^a, 2^a e 3^a geração de vacinas.

Vacinas de 1^a geração consistem no agente patogênico inteiro havendo a atenuação ou inativação dos microrganismos ou através de microrganismos não patogênicos provenientes de outros hospedeiros. Nessa categoria há a expressão de muitas regiões do genoma do parasito, oferecendo uma gama de alvos antigênicos. Essa abordagem apresenta uma metodologia mais simples e mostrou eficácia no combate de doenças como sarampo, rubéola, caxumba e varicela. Ao contrário das vacinas de 1^a geração, as vacinas de 2^a geração são caracterizadas pelo não uso de células e sim de toxinas purificadas, levando o anticorpo e linfócitos T a um número limitado de alvos antigênicos. As vacinas de 3^a geração, ou vacinas de DNA, utilizam informações genéticas do patógeno ou uma proteína, que gerará uma resposta imune. Esse tipo de imunização tem como vantagens a rápida proteção e alta estabilidade em temperatura ambiente. Com o avanço biotecnológico em vacinas de DNA, intensificaram-se os estudos nessa área. Os resultados são satisfatórios devido ao sucesso do DNA ao conseguir ultrapassar as membranas citoplasmáticas e nucleares, tornando as células transfectadas. Tais avanços motivam a investigação de novas descobertas através da biotecnologia moderna, principalmente pelo uso de técnicas de manipulação genética. Existindo dessa forma uma perspectiva cada vez maior do desenvolvimento de vacinas com efeito terapêutico para tumores, além de estimular a produção de imunizações cada vez mais precisas e seguras contra diversos tipos de agentes infecciosos e parasitários. Tornando-se claro a importância do papel da biotecnologia nos avanços de uma imunização mais confiável e eficaz (“Biotecnologia e suas contribuições para a evolução dos estudos e da produção de vacinas”, 2017).

Num âmbito microbiológico, devido à complexidade e evolução dos parasitos intracelulares, como é o caso dos agentes causadores da malária, leishmaniose, clamídia, tularémia e tuberculose, a vacinação pelas vacinas de 1ª e 2ª geração nunca se torna uma realidade. Assim, na tentativa de combater esses e outros patógenos responsáveis por inúmeras mortes anualmente, são propostas novas abordagens no campo da vacinologia (PITT e colab., 2013; SINGH e SUNDAR, 2012). A vacina vetorizada, como é o caso das vacinas de 3ª geração, emprega vírus, plasmídeos ou bactérias para expressar um fragmento específico de DNA do parasito capaz de gerar uma resposta imune. Esse tipo de vacina pode ser rapidamente ajustado para novas estirpes ou vírus. Podem ser fabricadas em grandes quantidades e são seguras. A produção do antígeno *in situ* é favorável à ocorrência da resposta celular e humoral. No entanto, apesar de apresentarem ótimos perfis de segurança, requerem altas doses e doses de reforço para que as respostas imunes sejam alcançadas (SRIDHAR, 2015).

2. GENÔMICA NA VACINOLOGIA

Tendo em vista o contexto histórico e a importância da vacina para os seres vivos, tem-se que os usos dessas técnicas fizeram e ainda fazem reajustes em seu meio para que as vacinas evoluam e se tornem cada vez mais seguras, eficazes e eficientes. Para que se tenha essa evolução no âmbito da vacinologia, cada vez mais técnicas de bioinformática vêm sendo utilizadas para esse aprimoramento, em prol do desenvolvimento de vacinas em que as metodologias tradicionais, como é o caso das vacinas de 1ª e 2ª geração, não foram capazes.

Atualmente a bioinformática é imprescindível para a manipulação dos dados biológicos. Ela pode ser definida como uma modalidade que abrange todos os aspectos de aquisição, processamento, armazenamento, distribuição, análise e interpretação da informação biológica. Através da combinação de procedimentos e técnicas da matemática, estatística e ciência da computação são elaboradas várias ferramentas que nos auxiliam a compreender o significado biológico representado nos dados genômicos. Além disso, através da criação de bancos de dados com as informações já processadas, acelera a investigação em outras áreas como a medicina, a biotecnologia, a agronomia (BORÉM A E SANTOS FR, 2001).

2.1. Aplicação Da Genômica Na Vaciniologia

A caracterização da genômica tem o intuito de contribuir e melhorar no processo de produção e no fornecimento de dados das vacinas. Não somente a genômica, mas o estudo das características biológicas e da estabilidade genética também auxiliam no controle de qualidade da vacina, no preparo de novos lotes e no domínio da informação sobre o produto apresentado (BORGES, 2007).

Os avanços concomitantes em algoritmos baseados em computador e "ômicas" como a proteômica, a transcriptômica, a genômica funcional e a biologia de sistemas ajudaram a extrair os dados do genoma e a integrá-los em conceitos de vacinas (RINAUDO e colab., 2009). Esta abordagem, chamada de "vaciniologia reversa", começa na sequência do genoma (e não na célula) para selecionar potenciais candidatos à vacina usando screening computadorizado de alto rendimento (GROOT, A.S. DE; RAPPUOLI, 2004).

2.2. Banco De Dados Genômicos

Devido a essa imensa quantidade de dados gerados em inúmeros laboratórios de todo o mundo, faz-se necessário organizá-los de maneira acessível, de modo a evitar redundância na pesquisa científica e possibilitar a análise por um maior número possível de cientistas. A construção de bancos de dados para armazenamento de informações de sequências de DNA e genomas inteiros, proteínas e suas estruturas tridimensionais, bem como vários outros produtos da era genômica, tem sido um grande desafio, mas simultaneamente extremamente importante (SANTOS e ORTEGA, 2002).

Para que estas descobertas sejam compartilhadas dentro da comunidade científica, foram desenvolvidos bancos de dados genéticos onde informações geradas por pesquisas em todo o mundo podem ser depositadas e acessadas. Nos bancos de dados há também uma grande variedade de informações sobre estruturas moleculares, expressão gênica diferencial, diversidade genética, evolução, etc. que podem ser extraídas pela bioinformática (SAFADY, 2021).

Serão citados neste capítulo alguns bancos de dados genéticos e seus processamentos para análise de variante: O NCBI (do inglês *National Center for Biotechnology Information*) (WHEELER e colab., 2006), ou Centro Nacional para Informação Biotecnológica dos EUA, é considerado o banco de dados central sobre

informações genômicas. O GenBank é o principal banco de dados do NCBI e armazena todas as sequências disponíveis publicamente de DNA (de sequências pequenas à genomas inteiros), RNA e proteínas. Além do GenBank, que coleta todas as entradas de sequências, outros bancos do NCBI apresentam as informações organizadas de diferentes maneiras. Por exemplo, o UniGene, que agrupa todas as sequências parciais do transcriptoma de um organismo em aglomerados ou clusters, onde cada aglomerado representa a sequência consenso de um gene. Ainda no NCBI, o banco de dados RefSeq reúne somente as sequências de referência, ou seja, a mais representativa sequência de um transcrito, editada e inspecionada por um curador. É, frequentemente, o melhor banco de dados para se evitar a redundância natural num universo com tantas informações.

Há também bancos que são específicos de um organismo, tal como o OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) (AMBERGER e HAMOSH, 2017) que foi criado para catalogar todos genes e alelos relacionados a doenças e outras características humanas, bem como proporcionar um detalhamento técnico e bibliografia referente a cada característica. Esses tipos de bancos, tidos como secundários, possuem uma importância no que tange à preservação de dados originais no GenBank.

É importante ressaltar que várias ferramentas desenvolvidas pela bioinformática permitem o acesso e análise dos dados no GenBank, onde a ferramenta mais popular para essa comparação de sequência de DNA com os bancos de dados genômico é o BLAST (do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*)(WHEELER e colab., 2006). Essa ferramenta permite comparar através de algoritmos uma sequência de DNA ou proteína (*query*) qualquer com todas sequências genômicas de domínio público. Tem como resultado servir para atribuir uma função a qualquer segmento de DNA que apresenta homologia significativa a outras sequências de DNA ou proteínas previamente depositadas no GenBank com função conhecida experimentalmente (Figura 5).

A importância desses bancos de dados genômicos de inúmeras espécies, é devido a genômica comparativa assumir cada vez mais um papel importante com a utilização de procedimentos computacionais na correlação entre organismos no nível molecular. Esse tipo de correlação permite uma visualização na história comparativa de segmentos de DNA que foram trocados entre espécies distintas, além de outras análises comparativas que estão emergindo devido o desenvolvimento desses bancos, tais como no desenvolvimento de tecidos e órgãos, base da resistência a doenças infecciosas,

prognóstico de câncer, etc. Para cada um desses propósitos, novas ferramentas de bioinformática são construídas e muitas delas são disponibilizadas através de servidores na Internet (SANTOS e ORTEGA, 2002).

Figura 5: Resultado de comparação com o BLAST.

Download ▾ GenPept Graphics

D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase [Rickettsia canadensis]
 Sequence ID: [WP_012148819.1](#) Length: 306 Number of Matches: 1
[See 1 more title\(s\)](#) ▾ [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 1 to 306 GenPept Graphics ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
626 bits(1615)	0.0	Compositional matrix adjust.	306/306(100%)	306/306(100%)	0/306(0%)
Query 1	MFSKFLLPYIFIATFFFAPISEAKKNVQNTLKPPVQTSLVIDAKSGKVLQSHNSQIPIYP				60
Sbjct 1	MFSKFLLPYIFIATFFFAPISEAKKNVQNTLKPPVQTSLVIDAKSGKVLQSHNSQIPIYP				60
Query 61	ASLTKLMTLYLMFESIEAGKLSLDKCLFVSAKASQMPCKLGLKAGETITVREAINGLII				120
Sbjct 61	ASLTKLMTLYLMFESIEAGKLSLDKCLFVSAKASQMPCKLGLKAGETITVREAINGLII				120
Query 121	KSANDA AVTVAENMGSEKAF AHL MNV KAKQLGMKNTYFKNASGWH DPLQQT TARDIAKL				180
Sbjct 121	KSANDA AVTVAENMGSEKAF AHL MNV KAKQLGMKNTYFKNASGWH DPLQQT TARDIAKL				180
Query 181	AMALKRDY PKYYPLFSKTSFVFRGNI INGHNRVTKNYQGAEGMKTGFHTPAGYNLVTTAS				240
Sbjct 181	AMALKRDY PKYYPLFSKTSFVFRGNI INGHNRVTKNYQGAEGMKTGFHTPAGYNLVTTAS				240
Query 241	RNGKSLI AVVTGSRSAVSRDQKMI GLLDHYFN IKPIAAKRSIKLASNNKSTTKAKSKIMK				300
Sbjct 241	RNGKSLI AVVTGSRSAVSRDQKMI GLLDHYFN IKPIAAKRSIKLASNNKSTTKAKSKIMK				300
Query 301	KKNIRS	306			
Sbjct 301	KKNIRS	306			

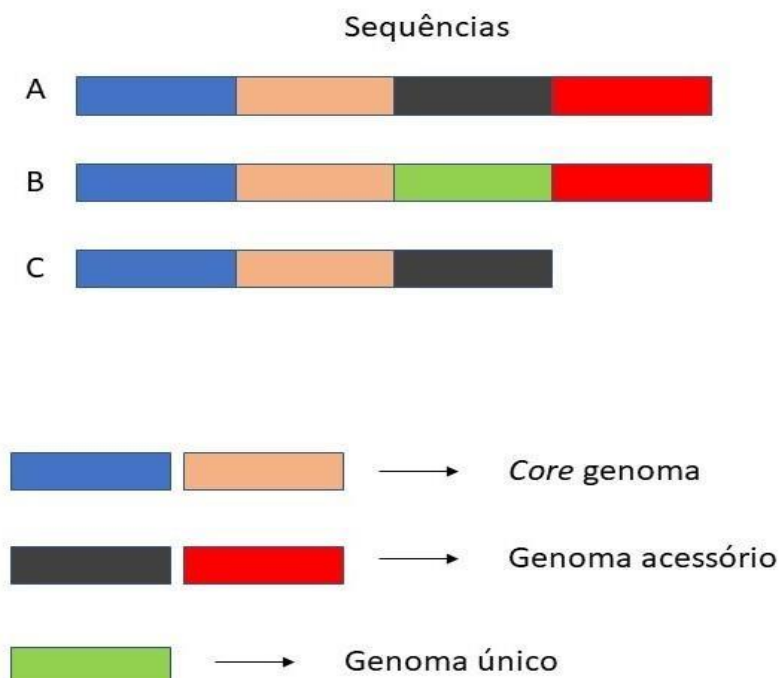
Fonte: Autoria própria (FELICE e colab., 2021).

3. PANGENÔMICA NA VACINOLOGIA

A pangenômica surge dentro da área da genômica possibilitando a comparação de diferentes organismos para fornecer uma visão de forma mais abrangente de uma espécie ou do gênero estudado (ALCARAZ e colab., 2010; SNIPEN e colab., 2009). Ela foi descrita pela primeira vez em 2005 por um grupo de pesquisadores que viram o surgimento de uma quantidade crescente de informações genômicas e que com isso poderiam descrever com mais precisão as espécies (TETTELIN e colab., 2005). Baseado nesses dados, outros estudos foram surgindo e ficou estabelecido que o pangenoma seria o repertório completo e não-redundante de genes de determinada espécie ou gênero, e poderia ser dividido em *core* genoma, genoma acessório ou *shared*, e genoma específico ou *singletons*. O *core* genoma representa todos os genes que estão presentes em todas as

linhagens do grupo estudado, normalmente, envolvidos em processos essenciais para a sobrevivência do organismo; o genoma acessório representa aqueles genes que são compartilhados por mais de uma linhagem, mas que não estão presentes em todas; e por fim, o genoma específico representa os genes que são únicos em cada linhagem (TETTELIN e colab., 2005, 2008) (Figura 6). Genes presentes nesses dois outros subconjuntos, normalmente estão envolvidos em processos de adaptação do organismo ao ambiente ou ao hospedeiro (MEDINI e colab., 2005). O pangenoma ainda pode ser extrapolado e classificado em pangenoma aberto ou fechado, de acordo com a Lei de Heap. Com isso, caso seja um pangenoma aberto, genes são adicionados ao pangenoma a cada novo genoma sequenciado, de forma que prever o tamanho do pangenoma completo se torna uma tarefa difícil. Caso seja fechado, poucos genes costumam ser adicionados por novo genoma sequenciado, de modo que o tamanho desse pangenoma completo pode ser previsto teoricamente. O tamanho da população e a versatilidade do nicho são sugeridos como os fatores mais influentes no processo de determinação do tamanho do pangenoma (TETTELIN e colab., 2005; VERNIKOS e colab., 2015).

Figura 6: Imagem representativa dos subgrupos do pangenoma.



Fonte: Autoria própria.

Com o surgimento dessa área, estudos utilizando a pangenômica e a vaciniologia reversa têm surgido para que com o complemento dessas áreas, possa se identificar os genes que fazem parte do core genoma, genoma acessório e genoma específico e revelar as diferenças de plasticidade genômica que podem ocorrer entre espécies. Por exemplo, recentemente, um grupo de pesquisadores utilizou essas duas abordagens para comparar linhagens de *Treponema pallidum*, de forma que com o core genoma encontrado na análise de pangenoma, puderam identificar, através da vaciniologia reversa, possíveis alvos vacinais contra a sífilis (JAISWAL e colab., 2017). Após isso, observaram uma correlação clonal grande, com aumento de pangenoma, e baseado nessas análises viram diferenças na presença / ausência de ilhas genômicas, como as ilhas de patogenicidade, importantes regiões com presenças de fatores de virulência (JAISWAL e colab., 2020).

Também já foi proposto um tipo de pipeline computacional integrativo, chamado de PanRV, que vai empregar abordagens de pangenoma com a vaciniologia reversa. Em um primeiro momento, os autores trazem que o pipeline é composto por quatro módulos funcionais e testado com dados genômicos de 301 linhagens de *Staphylococcus aureus*. Surge como o primeiro pipeline automatizado abrangente pra fazer a identificação de possíveis candidatos a vacina utilizando a exploração do pangenoma microbiano (NAZ e colab., 2019).

4. GENÔMICA SUBTRATIVA

4.1. Identificação De Alvos Vacinais

Durante o descobrimento de vacinas, uma etapa comum e extremamente importante é a identificação de proteínas antigênicas e genes alvos. Neste processo, podem ser utilizadas diversas abordagens para identificar e maximizar a qualidade dos alvos encontrados, reduzindo também a grande quantidade de proteínas presentes em patógenos, para um número consideravelmente menor, resultando nos melhores alvos. Portanto, ao analisar estas proteínas ou genes, há propriedades que devem ser levadas em conta, para uma melhor previsão e eficácia da vacina.

Neste contexto, existem abordagens *in silico*, que podem ser utilizadas para determinação de alvos vacinais. De acordo com (BARH e colab., 2011a), existem propriedades que um candidato a alvo deve cumprir para ser ideal. Neste meio surge a

genômica subtrativa, definida por ele, como sendo composta pela análise da essencialidade dos genes e proteínas, e pela não homologia dos alvos com o hospedeiro. Estes conceitos propostos, foram construindo o campo de estudo da genômica subtrativa, e cada vez mais são utilizados como abordagem para identificação de alvos vacinais.

4.2. A Subtração

A partir destes conceitos, a genômica subtrativa é utilizada tanto para a identificação de alvos vacinais, quanto de drogas. Para ambos, há a metodologia de identificação de “não homólogos ao hospedeiro” que é, em linhas gerais, uma subtração de sequências entre o genoma ou proteoma (genes ou proteínas) do microrganismo e do hospedeiro, com a implementação de regras específicas. Essa técnica oferece a oportunidade de encontrar proteínas que possuem até mesmo funções celulares ainda desconhecidas (UDDIN e colab., 2019). Segundo (BARH e colab., 2011), a subtração nesta metodologia vem literalmente de remover algo a baixo, ou seja, retirar uma parte menor de algo maior, sendo uma abordagem matemática para analisar diferenças entre montantes de mesma categoria. Assim, a genômica subtrativa é uma categoria da genômica comparativa, visto que é feito a comparação de dois genomas, identificando no de interesse, apenas os genes e proteínas específicos deste. Na prática, o genoma do patógeno que está sendo analisado é subtraído do genoma do hospedeiro, para a posterior análise de essencialidade dos genes únicos.

Para a vacinologia, essa parte da abordagem visa identificar alvos que não levem a uma reação cruzada e que tenham uma maior chance de desencadear uma resposta imunológica, visto que não são compartilhados com o hospedeiro. Assim também as vias físico-químicas e metabólicas dos alvos, e a composição estrutural da proteína, tendem a ser diferentes dos presentes no hospedeiro. Logo, uma vacina construída com base nestes alvos, tende a prejudicar apenas os sistemas do patógeno, sem afetar a fisiologia do hospedeiro (BARH e colab., 2011a).

4.3. A Essencialidade Dos Alvos E Sua Predição

Com os genes únicos do patógeno sendo definidos, resta identificar a essencialidade destes. Genes essenciais são comumente definidos como genes indispensáveis para sustentar a vida celular. Assim, a sobrevivência, o crescimento e a

flexibilidade de uma espécie estão diretamente relacionadas a isto. Portanto, tê-los como alvos no descobrimento de vacinas, é uma abordagem relevante, visto que sua deficiência ou inibição tende a ser letal para o microrganismo. Também por serem essenciais, sua conservação em diversas linhagens de um patógeno, e até mesmo em outras espécies, é algo provável (COMMICHAU e colab., 2013; KOONIN e colab., 1998; TRAUT, 1998). Com isso, futuras vacinas feitas a partir destes alvos, tendem a manter sua cobertura por um período maior, visto que os microrganismos dificilmente perdem estes componentes, em relação a proteínas e genes não essenciais.

O sequenciamento de genomas inteiros associados a técnica de inativação de genes específicos em escala genômica, determinaram para diversas espécies, o conjunto de genes essenciais. Nesse cenário, existem diversas ferramentas para prever se um gene é essencial para a sobrevivência de um organismo. Entre elas, há o DEG (ZHANG, 2004) (banco de dados de genes essenciais), uma das principais ferramentas nesta área, que pode ser utilizado tanto na genômica comparativa quanto na subtrativa. Ele contém uma lista de genes essenciais experimentalmente validados para bactérias, fungos, e outros, e pode ser utilizado para a consulta de sequências, procurando por homologia (BLAST) contra o banco de dados do DEG.

Outras ferramentas também surgiram, e trazem abordagens com base na ortologia e filogenia, como por exemplo GepTop2.0 (WEN e colab., 2019). Há ainda algumas abordagens que procuram por genes e proteínas essenciais especificamente durante o processo de infecção, visto que alguns genes podem ser essenciais durante a vida do patógeno fora do hospedeiro, mas não durante o processo infeccioso, ou o inverso. É o caso da ferramenta BacFitBase (RENDÓN e colab., 2020), que com base em resultados validados experimentalmente, amplia o campo de estudo da essencialidade genômica, sendo possivelmente mais específico no descobrimento de vacinas.

4.4. Localização Subcelular

Assim, se define o objetivo principal da genômica subtrativa, eliminando genes não essenciais ou que são homólogos ao hospedeiro, reduzindo também todo um genoma, para apenas alguns genes candidatos a alvos. Finalmente todos os alvos selecionados, podem ainda passar por filtros, direcionando a identificação de alvos, para alvos de drogas, ou alvos vacinais. Para o descobrimento de vacinas, bons alvos normalmente estão localizados na

membrana, ou expostas à superfície do patógeno, podendo ainda serem secretadas, visto que são as primeiras a entrarem em contato com o sistema imune do hospedeiro (BARINOV e colab., 2009).

Portanto, um último fator, que deve ser analisado, juntamente com as características próprias dos alvos candidatos, é sua localização subcelular, direcionando os mais expostos ao sistema imune, como os melhores candidatos a alvos vacinais. Por estes motivos, a genômica subtrativa tem sido amplamente utilizada por diversos pesquisadores, e tem demonstrado ser altamente eficiente, prevendo alvos vacinais para diversas espécies patogênicas como: *Treponema pallidum*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Burkholderia pseudomallei* (HIZBULLAH e colab., 2018; JAISWAL e colab., 2017; RODRIGUES e colab., 2019), podendo ainda ser mais desenvolvida e utilizada no futuro.

5. VACINOLOGIA REVERSA

O termo “Vacinação Reversa” foi cunhado na transição ao Século XXI por Rino Rappuoli, para explicar um método adotado para a produção de vacinas de subunidades, ou seja, vacinas desenvolvidas a partir da identificação e seleção de antígenos que possam causar proteção imunológica contra o agente causador de uma determinada doença infecciosa, sem a necessidade de sua presença de forma inativa ou atenuada. Tal método compreende, a princípio, a identificação em larga escala de candidatos proteicos, mesmo daqueles fracamente expressos e com funções desconhecidas, pois se baseia na identificação de *loci* no genoma do patógeno para a predição *in silico* das sequências peptídicas de acordo com as fases de leitura aberta (*open reading frame*). Portanto, daí o termo “reverso” em virtude da necessidade deste passo adicional, de recuo, antes da sintetização de peptídeos, potencialmente imunogênicos, para os testes *in vivo* (RAPPUOLI, 2000)

A aplicação da vacinação reversa pode acelerar em torno de cinco vezes o tempo dispendido para o desenvolvimento de uma vacina aos seres humanos em detrimento do desenvolvimento convencional, no qual as proteínas supostamente antigênicas são purificadas e testadas quanto a imunogenicidade e convalescença ao soro de pacientes recuperados, e os genes selecionados podem ser clonados em vetores de plasmídeos ou expressos por outros métodos mais recentes (LEITNER e colab., 1999; NASCIMENTO e LEITE, 2012; PARDI, NORBERT, MICHAEL J. HOGAN, FREDERICK W.

PORTER, 2021; RAPPUOLI, 2000; RAUCH e colab., 2018). Em decorrência da tecnologia pouco avançada de 1998, a criação de uma vacina para *Neisseria meningitidis* (sorogrupo B), desde a vacinação reversa até a etapa de licenciamento humano, levou 15 anos (DEL TORDELLO e colab., 2017), enquanto que a redução gradativa dos custos dos métodos de sequenciamento e de outras técnicas laboratoriais já nos permitem a introdução de novas vacinas em tempo recorde aproximado de 1,5 anos, como é o caso das vacinas contra SARS-CoV-2 (CREECH, C. BUDDY, SHANNON C. WALKER, 2021). Contudo, apesar do apoio de ferramentas atuais de Bioinformática para a avaliação da antigenicidade, essencialidade, localização celular, não homologia ao hospedeiro ou ao microbioma, predição de epítomos e simulação de respostas imunes específicas (RAWAL e colab., 2021), os ensaios *in vitro* ainda são necessários para avaliar a presença, a abundância dos candidatos vacinais em amostras de hospedeiros infectados e se de fato promovem imunidade (RIDZON, RENÉE, 1999), o que continua sendo desafiador.

Para que uma vacina seja adequada à aplicação humana, também é necessário que seja solúvel, estável, atóxica, não alergênica e preferencialmente gere proteção cruzada contra outras linhagens virulentas da mesma espécie do agente infeccioso (RAWAL e colab., 2021). Porém, dentre os fatores desafiadores para a proteção do hospedeiro, é possível destacar o custo em testar a grande quantidade de antígenos preditos para os ensaios pré-clínicos, a variação estrutural e a expressão heterogênea dos antígenos entre as fases de desenvolvimento ou formas de vida do patógeno (HOFFMAN e colab., 1998; RÉNIA, LAURENT, 2016), a variação nas sequências gênicas como os polimorfismos de nucleotídeo único (MAIZELS e KURNIAWAN-ATMADJA, 2002; RÉNIA, LAURENT, 2016) a variação conformacional da exposição de resíduos na superfície da membrana celular (OSCHERWITZ, 2016; ZOLLINGER, 1990) e a impossibilidade do formato atual da vacinação reversa em predizer antígenos exclusivamente não proteicos (RAPPUOLI, 2000).

Por outro lado, o desenvolvimento da vacinação reversa tem sido favorecida pelas técnicas de sequenciamento de nova geração (SLATKO e colab., 2018), pelos avanços nos métodos de cultivo e isolamento de microrganismos (HAHN e colab., 2019) e pelos novos métodos matemáticos ou pela incorporação de redes neurais ou aprendizagem de máquina e atualizações de precisão incorporados aos *pipelines* e às ferramentas de

predição e de análise *in silico* (ALMAGRO ARMENTEROS e colab., 2019; DALSSASS e colab., 2019). Além disso, a alta diversidade de alvos disponíveis também auxilia na tentativa de complementar a elicitação da resposta imune (com o auxílio de adjuvantes) e substituir, por exemplo, a necessidade da presença de antígenos mais complexos em vacinas para promover a imunidade, como as moléculas glicolípídicas, lipopolissacarídeos e polissacarídeos (TRIER e colab., 2019).

Atualmente, a vacinação reversa ainda recebe o apoio informacional de outras áreas das ciências “ômicas”, como da Epigenômica e Transcriptômica para avaliar a possibilidade de expressão dos genes (e de suas isoformas) no tecido ou em uma única célula, da Proteômica para a análise da existência e das propriedades das moléculas proteicas propriamente ditas e de suas interações, da Metabolômica ao produzir resposta imunológica contra moléculas chave das vias do organismo estudado, além das análises de microbiomas de sítios específicos e como são reorganizadas as populações de microrganismos após a vacinação (RAEVEN e colab., 2019). Essa contextualização caracteriza o estudo dos “sistemas de vacinação”, cujas modificações orgânicas proporcionadas pela aplicação da vacinação são refletidas nas assinaturas moleculares sítio-específicas do indivíduo imunizado e alguns desses perfis já estão disponíveis ao público científico em banco de dados (LIBERZON e colab., 2015).

6. SOFTWARES UTILIZADOS EM VACINOLOGIA REVERSA DE BACTÉRIAS

6.1. *Software Orthofinder*

Inicialmente, utilizamos um programa para analisar a ortologia de todas as proteínas em todos os genomas. O *software* OrthoFinder, uma plataforma precisa e rápida para realizar a genômica comparativa, é um exemplo. É dada a entrada com arquivos de sequência de aminoácidos das proteínas em formato FASTA, no caso seriam sequências do patógeno de interesse, e, a partir deles, o programa encontra ortogrupos e ortólogos. Esses ortogrupos são utilizados para inferir árvores de genes para identificar a árvore de espécies enraizadas, depois é identificado todos os eventos de duplicação de genes e, por fim, ele analisa todas as informações filogenéticas para identificar o conjunto completo de ortólogos entre todas as espécies (EMMS e KELLY, 2015). Esses grupos

acabam se dividindo em *core* genoma, genoma acessório e genoma único (TETTELIN e colab., 2008).

Após isso, podem ser utilizados scripts que realizam comparação entre genes do patógeno e genes do hospedeiro (humano) para obter sequências de genes core non-host, que são as proteínas pertencentes ao core genoma do patógeno, porém não-homólogas ao do hospedeiro, com o intuito de evitar possíveis reações adversas.

6.2. Software SurfG+

Após identificação dos genes core non-host, o resultado é inserido no *software* SurfG+. SurfG+ é um programa que efetua processamento em lote de várias ferramentas de bioinformática padrão para prever especificamente proteínas que se projetam para fora da camada de peptidoglicano da bactéria. Para análise de uma bactéria Gram-positiva é implantado o protocolo *Inmembrane*, que utiliza preditores de localização única existentes para inferir a provável localização subcelular e a exposição de superfície de proteína em um proteoma. Dessa lógica, é classificado as proteínas como potencialmente expostas à superfície (“PSE”), secretadas ou não expostas (proteínas citoplasmática e de membrana). Para bactérias Gram-negativas, seguem o mesmo protocolo das bactérias Gram-positivas, entretanto, por elas terem uma camada a mais de membrana, o protocolo Gram-negativo identifica mais o sinal de retenção de membrana interna (Asp+2) para diferenciação de lipoproteínas da membrana externa e daquelas retidas na membrana interna (PERRY e HO, 2013).

6.3. Software Vaxign

As proteínas identificadas como de membrana, potencialmente expostas à superfície (PSE) ou secretadas podem ser direcionadas para softwares como Vaxign e Vaxijen por serem ótimos alvos para desenvolvimento de vacinas. No Vaxign é feito a predição do domínio transmembrana, características da hélice transmembrana, cálculo da probabilidade de adesão, conservação de proteínas entre diferentes genomas, comparação de similaridade de sequência entre pré-proteínas e do proteoma do hospedeiro e predição de epítomos de ligação ao MHC de classe I e classe II. Levando em conta a probabilidade de adesão, proteínas com probabilidade $\geq 0,51$ são consideradas candidatas a alvos vacinais (HE e colab., 2010).

6.4. *Database Of Essential Genes (DEG)*

Após determinar os candidatos de alvos vacinais do *software* Vaxign (proteínas com probabilidade de adesão $\geq 0,51$) e de alvos de drogas pelo *software* MHOLline (sequências com qualidade “Alta” e “Muito alta”), essas proteínas são submetidas ao DEG, um banco de dados de genes essenciais, que analisa se essas proteínas participam de processos biológicos indispensáveis das bactérias (ZHANG, 2004).

7. CONCLUSÃO

Os mecanismos de imunização variaram muito desde as primeiras experiências em séculos anteriores e com o avanço cada vez mais rápido da ciência essas mudanças estão se tornando cada vez mais rápidas e impactantes. Inicialmente, eram feitos apenas testes pouco controlados e diretamente nas pessoas, algo que atualmente não é mais preconizado e só acontece quando um número importante de outros testes pré-clínicos são realizados. Com o advento das novas tecnologias e com o passar dos anos, os estudos e as etapas de construção das vacinas foram melhorados e uma grande quantidade de dados para o melhor entendimento de toda essa relação começou a ser produzido. Com essa grande quantidade de dados que surgiram, houve a necessidade também de uma organização destes em bancos de dados e isso proporcionou a facilidade de compartilhar dados de pesquisas, evitando redundâncias.

A vaciniologia reversa, que surgiu recentemente, atualizou o processo de estudo dos mecanismos da imunização, e deixou esse processo muito mais claro. Programas foram criados, e outros são criados a todo momento, e com isso o processamento de dados de pesquisas superou as dificuldades ao redor do mundo, e deixou mais prático, mais rápido e mais barato a produção de imunizantes. Espera-se que com essa nova tecnologia novas vacinas para diferentes agressores, infecciosos ou não, sejam produzidas e doenças que até então são um problema de saúde pública passem a ser totalmente controlados em toda a população mundial.

REFERÊNCIAS

ALCARAZ, Luis D. e colab. **Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics**. BMC Genomics, v. 11, n. 1, 2010.

ALMAGRO ARMENTEROS, José Juan e colab. **SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks**. Nature Biotechnology, v. 37, n. 4, p. 420–423, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>.

AMBERGER, Joanna S. e HAMOSH, Ada. **Searching online mendelian inheritance in man (OMIM): A knowledgebase of human genes and genetic phenotypes**. Current Protocols in Bioinformatics, v. 2017, p. 1.2.1-1.2.12, 2017. Doi:<https://dx.doi.org/10.1002%2Fcpbi.27>.

BARH, Debmalya e colab. **In silico subtractive genomics for target identification in human bacterial pathogens**. Drug Development Research, v. 72, n. 2, p. 162–177, 2011a. Doi: <https://doi.org/10.1002/ddr.20413>.

BARH, Debmalya e colab. **In silico subtractive genomics for target identification in human bacterial pathogens**. Drug Development Research, v. 72, n. 2, p. 162–177, 2011b.

BARINOV, Aleksandr e colab. **Prediction of surface exposed proteins in *Streptococcus pyogenes*, with a potential application to other Gram-positive bacteria**. Proteomics, v. 9, n. 1, p. 61–73, 2009. Doi: 10.1002/pmic.200800195.

Biotecnologia e suas contribuições para a evolução dos estudos e da produção de vacinas. 2017, [S.l.: s.n.], 2017. Disponível em: <<https://ead.ifrn.edu.br/coloquio/trabalhos-por-eixo-tematico/>>.

BORÉM A E SANTOS FR. **Biотecnologia Simplificada**. Viçosa: [s.n.], 2001.

BORGES, Maria Beatriz Junqueira. **Caracterização Genômica e Biológica do Vírus do Sarampo Cepa Vacinal CAM-70**. 2007. Instituto Oswaldo Cruz, 2007. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/35560/2/maria_beatriz_junqueira_borges.pdf>.

COMMICHAU, Fabian M. e PIETACK, Nico e STÜLKE, Jörg. **Essential genes in *Bacillus subtilis*: A re-evaluation after ten years**. Molecular BioSystems, v. 9, n. 6, p. 1068–1075, 2013. Doi: 10.1039/c3mb25595f.

CREECH, C. BUDDY, SHANNON C. WALKER, E Robert J. Samuels. **SARS-CoV-2 Vaccines**. JAMA, v. 325, n. 13, p. 1318–1320, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1001/jama.2021.3199>.

DAIANE HARTWIG. **Vaciniologia e Engenharia de Vacinas**. Disponível em: <<http://www2.ufpel.edu.br/biotecnologia/gbiotec/site/content/paginadoprofessor/uploadsprofessor/f7bf4b5f253ea02b6e3b736af174f193.pdf>>. Acesso em: 8 nov 2021.

DALSASS, Mattia e colab. **Comparison of open-source reverse vaccinology programs for bacterial vaccine antigen discovery**. Frontiers in Immunology, v. 10, n. FEB, 2019. Doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00113>.

DEL TORDELLO, E. e RAPPUOLI, R. e DELANY, I. Reverse Vaccinology: Exploiting Genomes for Vaccine Design. Human Vaccines: Emerging Technologies in Design and Development. [S.l.: s.n.], 2017. p. 65–86. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802302-0.00002-9>.

EMMS, David M. e KELLY, Steven. **OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy**. *Genome Biology*, v. 16, n. 1, 2015. Doi: 10.1186/s13059-015-0721-2.

FELICE, Andrei G. e colab. **Pan-genomic analyses of 47 complete genomes of the *Rickettsia* genus and prediction of new vaccine targets and virulence factors of the species**. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1898473>

FIOCRUZ. **Vacinas: as origens, a importância e os novos debates sobre seu uso - Bio-Manguinhos/Fiocruz || Inovação em saúde || Vacinas, kits para diagnósticos e biofármacos**. Disponível em: <<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/noticias/1263-vacinas-as-origens-a-importancia-e-os-novos-debates-sobre-seuuso?showall=1&limitstart=>>>.

GROOT, A.S. DE; RAPPUOLI, R. **Genome-derived vaccines**. *Expert Review of Vaccines*, v. 3, n. 1, p. 59–76, 2004.

HAHN, Martin W. e KOLL, Ulrike e SCHMIDT, Johanna. **Isolation and Cultivation of Bacteria**. *The Structure and Function of Aquatic Microbial Communities*, p. 313–351, 2019. Doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-16775-2_10.

HE, Yongqun e XIANG, Zuoshuang e MOBLEY, Harry L.T. **Vaxign: The first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vaccine development**. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2010, 2010.

HINE, D. **Public Health at the Crossroads: Achievements and Prospects**. *Jrsm*, v. 97, n. 9, p. 450–451, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1079596/>>.

HIZBULLAH e colab. **Reverse vaccinology and subtractive genomics-based putative vaccine targets identification for *Burkholderia pseudomallei* Bp1651**. *Microbial Pathogenesis*, v. 125, p. 219–229, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.09.033>.

HOFFMAN, S. L. e colab. **From genomics to vaccines: Malaria as a model system**. *Nature Medicine*, v. 4, n. 12, p. 1351–1353, 1998. Doi: <https://doi.org/10.1038/3934>.

INSTITUTO BUTANTAN. **Imunização, uma descoberta da ciência que vem salvando vidas desde o século XVIII**. Disponível em: <<https://butantan.gov.br/noticias/imunizacao-uma-descoberta-da-ciencia-que-vem-salvando-vidas-desde-o-seculo-xviii>>. Acesso em: 8 nov 2021.

JAISSWAL, Arun Kumar e colab. **An in silico identification of common putative vaccine candidates against *Treponema pallidum*: A reverse vaccinology and subtractive genomics based approach**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 2, 2017. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms18020402>.

JAISSWAL, Arun Kumar e colab. **The pan-genome of *Treponema pallidum* reveals differences in genome plasticity between subspecies related to venereal and non-venereal syphilis**. *BMC Genomics*, v. 21, n. 1, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6430-6>.

JOSEFSBERG, Jessica O. e BUCKLAND, Barry. **Vaccine process technology**. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 109, n. 6, p. 1443–1460, 2012. DOI: 10.1002/bit.24493.

KOONIN, Eugene V. e TATUSOV, Roman L. e GALPERIN, Michael Y. **Beyond complete genomes: From sequence to structure and function**. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 8, n. 3, p. 355–363, 1998. Doi: <[https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(98\)80070-5](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(98)80070-5)>.

LEITNER, Wolfgang W. e YING, Han e RESTIFO, Nicholas P. DNA and RNA-based vaccines: Principles, progress and prospects. *Vaccine*. [S.l: s.n.], 1999. v. 18. p. 765–777.

LIBERZON, Arthur e colab. **The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection**. *Cell Systems*, v. 1, n. 6, p. 417–425, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.12.004>.

MAIZELS, R. M. e KURNIAWAN-ATMADJA, A. **Variation and polymorphism in helminth parasites**. *Parasitology*, v. 125, n. SUPPL., 2002. Doi: <https://doi.org/10.1017/s0031182002001890>.

MCNALLY, Joseph. **Biography: A brief life of Dr Edward Jenner**. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, v. 12, n. 1, p. 81–84, 2001. Doi: <https://doi.org/10.1053/spid.2001.21366>.

MEDINI, Duccio e colab. **The microbial pan-genome**. *Current Opinion in Genetics and Development*, v. 15, n. 6, p. 589–594, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **A HISTÓRIA DAS VACINAS: UMA TÉCNICA MILENAR**. Disponível em: <http://www.ccms.saude.gov.br/revolta/pdf/M7.pdf>. Acesso em: 8 nov 2021a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Sistema Único de Saúde (SUS): estrutura, princípios e como funciona**. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/sistema-unico-de-saude>. Acesso em: 8 nov 2021b.

NASCIMENTO, I. P. e LEITE, L. C.C. **Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies**. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 45, n. 12, p. 1102–1111, 2012. Doi <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500142>.

NAZ, Kanwal e colab. **PanRV: Pangenome-reverse vaccinology approach for identifications of potential vaccine candidates in microbial pangenome**. *BMC Bioinformatics*, v. 20, n. 1, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2713-9>.

OSCHERWITZ, Jon. **The promise and challenge of epitope-focused vaccines**. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 12, n. 8, p. 2113–2116, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1160977>.

PARDI, NORBERT, MICHAEL J. HOGAN, FREDERICK W. PORTER, E Drew Weissman. mRNA vaccines — a new era in vaccinology | *Nature Reviews Drug Discovery*. [S.l: s.n.], 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrd.2017.243>.

PERRY, Andrew J. e HO, Bosco K. **Inmembrane, a bioinformatic workflow for annotation of bacterial cell-surface proteomes**. *Source Code for Biology and Medicine*, v. 8, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1186/1751-0473-8-9>.

PITT, Jonathan M. e colab. **Vaccination against tuberculosis: How can we better BCG?** *Microbial Pathogenesis*, v. 58, p. 2–16, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2012.12.002>.

RAEVEN, René H.M. e colab. **Systems vaccinology and big data in the vaccine development chain**. *Immunology*, v. 156, n. 1, p. 33–46, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1111/imm.13012>.

RAPPUOLI, Rino. **Reverse Vaccinology**. *Current Opinion in Microbiology*, v. 3, n. 5, p. 445–450, 2000. Doi: [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00119-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00119-3).

RAUCH, Susanne e colab. **New vaccine technologies to combat outbreak situations**. *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. SEP, 2018. Doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01963>.

RAWAL, Kamal e colab. **Identification of vaccine targets in pathogens and design of a vaccine using computational approaches**. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, 2021. Doi: <<https://doi.org/10.1038/s41598-021-96863-x>>.

RENDÓN, Javier Mac Ho e colab. **BacFITBase: A database to assess the relevance of bacterial genes during host infection**. *Nucleic Acids Research*, v. 48, n. D1, p. D511–D516, 2020. Doi: <<https://doi.org/10.1093/nar/gkz931>>.

RÉNIA, LAURENT, E Yun Shan Goh. **Malaria Parasites: The Great Escape**. *Frontiers in Immunology*, v. 7, n. 463, 2016. Doi <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00463>>.

RIDZON, RENÉE, E Margaret Hannan. **Tuberculosis Vaccines**. *Science*, v. 286, n. 5443, p. 1297–1297, 1999. Doi: <<https://doi.org/10.1126/science.286.5443.1297e>>.

RINAUDO, C. Daniela e colab. **Vaccinology in the genome era**. *Journal of Clinical Investigation*, v. 119, n. 9, p. 2515–2525, 2009.

RODRIGUES, Thaís Cristina Vilela e colab. **Reverse vaccinology and subtractive genomics reveal new therapeutic targets against *Mycoplasma pneumoniae*: A causative agent of pneumonia**. *Royal Society Open Science*, v. 6, n. 7, 2019. Doi: <doi.org/10.1098/rsos.190907>.

SAFADY, NÁGELA G. **Principais bancos de dados genéticos**. Disponível em: <<https://blog.varsomics.com/principais-bancos-de-dados-geneticos/>>. Acesso em: 17 nov 2021.

SANTOS, Fabrício R. e ORTEGA, E José Miguel. **Bioinformática aplicada à Genômica**. Disponível em: <[https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4154697/mod_resource/content/1/Bioinformática e genômica.pdf#:~:text=Atualmente a bioinformática é imprescindível para a manipulação dos dados biológicos.&text=Através da combinação de procedimentos,biológico rep](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4154697/mod_resource/content/1/Bioinformática_e_genômica.pdf#:~:text=Atualmente a bioinformática é imprescindível para a manipulação dos dados biológicos.&text=Através da combinação de procedimentos,biológico rep)>. Acesso em: 17 nov 2021.

SINGH, Bhawana e SUNDAR, Shyam. **Leishmaniasis: Vaccine candidates and perspectives**. *Vaccine*, v. 30, n. 26, p. 3834–3842, 2012. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.03.068>>.

SLATKO, B.E. e GARDNER, A.F. e AUSUBEL, F.M. **Overview of next generation sequencing technologies (and bioinformatics) in cancer**. *Molecular Biology*, v. 122, n. 1, p. 1–15, 2018.

SNIPEN, Lars e ALMØY, Trygve e USSERY, David W. **Microbial comparative pan-genomics using binomial mixture models**. *BMC Genomics*, v. 10, 2009.

SRIDHAR, Saranya. **Clinical development of Ebola vaccines**. *Therapeutic Advances in Vaccines*, v. 3, n. 5–6, p. 125–138, 2015. Doi: <<https://doi.org/10.1177/2051013615611017>>.

TETTELIN, Hervé e colab. **Comparative genomics: the bacterial pan-genome**. *Current Opinion in Microbiology*, v. 11, n. 5, p. 472–477, 2008. Doi: <[10.1016/j.mib.2008.09.006](https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.006)>.

TETTELIN, Hervé e colab. **Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial “pan-genome”**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 39, p. 13950–13955, 2005.

TRAUT, T. **A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes**. *Chemtracts*, v. 11, n. 3, p. 234, 1998. Doi: <<https://doi.org/10.1073/pnas.93.19.10268>>.

TRIER, Nicole e HANSEN, Paul e HOUEN, Gunnar. **Peptides, antibodies, peptide antibodies and more**. International Journal of Molecular Sciences, v. 20, n. 24, 2019. Doi: <<https://doi.org/10.3390/ijms20246289>>.

UDDIN, Reaz e colab. **Proteome-wide subtractive approach to prioritize a hypothetical protein of XDR-Myco**acterium tuberculosis** as potential drug target**. Genes and Genomics, v. 41, n. 11, p. 1281–1292, 2019. Doi: <<https://doi.org/10.1007/s13258-019-00857-z>>.

VERNIKOS, George e colab. **Ten years of pan-genome analyses**. Current Opinion in Microbiology, v. 23, p. 148–154, 2015. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.016>>.

WALDMAN, Eliseu Alves e SATO, Helena Keico e FREITAS, Fabiana Ramos Martin De. Epidemiologia Aplicada à Vacinação. Imunizações: Fundamentos e Prática. [S.l: s.n.], 2008. p. 53–67.

WEN, Qing Feng e colab. **Geptop 2.0: An updated, more precise, and faster Geptop server for identification of prokaryotic essential genes**. Frontiers in Microbiology, v. 10, n. JUN, 2019. Doi: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01236>>.

WHEELER, David L. e colab. **Database resources of the National Center for Biotechnology Information**. Nucleic acids research, v. 34, n. Database issue, 2006. Doi: <<https://dx.doi.org/10.1093%2Fnar%2Fgkv1290>>.

ZHANG, R. **DEG: a database of essential genes**. Nucleic Acids Research, v. 32, n. 90001, p. 271D – 272, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14681410>>.

ZOLLINGER, W. **New and Improved Vaccines Against Meningococcal Disease**. 1990. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/New-and-Improved-Vaccines-Against-Meningococcal-Zollinger/8bfe8695ba3428b2f42d1fe420445f15e65cfcfb>>.

CAPÍTULO 06

Uso De Bactérias Lácticas Como Vetores De Entrega De Vacinas Recombinantes

Monique Ferrary Américo ¹; Andria dos Santos Freitas ²;
Tales Fernando da Silva ²; Luís Lima de Jesus ²; Fernanda Alvarenga Lima ²;
Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho ³; Vasco Ariston de Carvalho Azevedo ⁴

¹ Mestranda em Genética. Programa de Pós-Graduação em Genética. Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

² Doutorando(a) em Genética. Programa de Pós-Graduação em Genética. Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

³ Professor Visitante no Departamento de Bioquímica e Biofísica. Universidade Federal da Bahia - UFBA

⁴ Professor Titular no Departamento de Genética Ecologia e Evolução. Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

RESUMO

A vacinologia tem avançado rapidamente apesar de ser um campo relativamente novo da Ciência. Entre as várias estratégias que vem sendo utilizadas para o controle de doenças, o uso da tecnologia do DNA recombinante tem trazido perspectivas animadoras para o desenvolvimento de vacinas mais seguras e mais eficazes, incluindo para novos patógenos emergentes. Neste contexto, destaca-se o uso de bactérias lácticas como vetores e adjuvantes. Este capítulo contém uma revisão descritiva sobre os mais relevantes tópicos envolvendo vacinas recombinantes, incluindo a história da arte, mecanismos, estratégias imunizantes e avanços recentes obtidos em estudos de prova de conceito para o desenvolvimento de novas vacinas.

Palavras-chave: Bactérias Lácticas. Biotecnologia. Vacinas de DNA. Imunologia de mucosas.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Categorias de vacinas*

Vacinas são compostos biológicos que podem ser usados para induzir respostas imunes, conferindo proteção contra doenças infecciosas ou neoplásicas. Para isto, os compostos biológicos utilizados em suas formulações devem ser modificados de maneira a não causarem danos ao organismo, mas ainda serem capazes de gerar uma imunidade duradoura para neutralizar infecções futuras¹. As vacinas podem ser administradas por diversas vias, podendo destacar oral, subcutânea, intramuscular, intradérmica e intranasal, ou combinações de mais de um tipo a depender das características das formulações vacinais e também das propriedades biológicas do agente patogênico². Uma vez introduzida nos tecidos, a maioria das vacinas convencionais desencadeiam uma resposta do tipo humoral (anticorpo específica), após serem apresentadas ao sistema imune adaptativo pelas moléculas de MHC de classe II, mediada principalmente por células B, responsáveis por produzirem anticorpos, e por células T, que auxiliam no processo induzindo maturação das células B nos órgãos linfoides. Contudo, algumas vacinas são capazes de estimular um tipo de resposta conhecido como imunidade celular a qual é mediada por células T e outras células do sistema imune inato, importantes para o controle e eliminação de uma infecção estabelecida, principalmente de patógenos intracelulares³.

Por mais de um século, a humanidade tem desenvolvido vacinas que se enquadram em dois grupos, vivas ou não-vivas, conforme sua composição. No primeiro caso, as vacinas contêm linhagens atenuadas do patógeno (ou seja, que perderam a capacidade de causar doença), mas que conseguem se replicar no nosso organismo. No grupo de vacinas não-vivas encontram-se linhagens de patógenos mortos ou apenas alguns de seus componentes⁴. Neste contexto, as vacinas vivas são indicadas apenas para indivíduos imunocompetentes, nos quais elas se multiplicam apenas o suficiente para causar uma forte resposta, mas não a ponto de levar a manifestações clínicas da doença. Entretanto, este grupo de vacinas apresenta grande risco para pacientes imunocomprometidos, pois podem se replicar de maneira descontrolada, principalmente naqueles sob tratamento com medicamentos imunossupressores e portadores de imunodeficiências genéticas ou adquiridas por infecção pelo HIV⁵. Em contrapartida, as vacinas não-vivas são consideradas seguras,

inclusive para este grupo de pacientes. Porém, geralmente não induzem respostas imunes tão fortes quanto as vacinas vivas atenuadas, sendo necessárias múltiplas doses para conferir uma proteção eficiente ao indivíduo. Entre os tipos de componentes antigênicos das vacinas não-vivas, estão incluídas as células de microrganismos mortos, vírus inativados, subunidades de proteínas e polissacarídeos purificados tais como as vacinas toxóides, assim denominadas por conta do uso de toxinas como antígenos isolados do patógeno¹.

1.2 Vacinas recombinantes

Nas últimas décadas, avanços recentes em biologia molecular têm permitido o desenvolvimento de novas abordagens baseadas na tecnologia do DNA recombinante, das quais se destacam a utilização de vírus e bactérias para a produção e/ou como veículo de entrega de vacinas de DNA, RNA ou proteínas⁶.

Muitas das vacinas não-vivas baseadas em componentes proteicos tem utilizado a tecnologia do DNA recombinante, colocando em destaque as vacinas contra a Hepatite B e o Vírus do Papiloma Humano⁷. Através de técnicas de clonagem molecular, é possível inserir genes codificadores de antígenos de qualquer patógeno através do uso de sistemas de expressão gênica, normalmente se utilizando de plasmídeos, um tipo de material genético encontrado nas bactérias. Neste contexto, bactérias como a *Escherichia coli* tem sido utilizadas em biofermentadores como usina para produção de antígenos de proteínas recombinantes⁸. Esta estratégia é extremamente segura, apresenta baixo custo e versatilidade, permitindo que múltiplos epítomos de patógenos sejam produzidos em uma única molécula peptídica em larga escala. Entretanto, como desvantagem, a maioria delas não induzem respostas fortes quando administradas isoladamente e requerem o uso de adjuvantes para conferir uma ação protetora⁶.

As vacinas de DNA consistem em sistemas de expressão que codificam genes de antígenos diretamente nas células eucarióticas. O mecanismo por trás desta abordagem permite que o antígeno seja expresso, ou seja que um fragmento do DNA do patógeno seja “lido” diretamente pelas células do hospedeiro de forma semelhante ao que ocorre durante uma infecção viral⁹. Apesar de muitas ainda estarem em estágio inicial de desenvolvimento, vacinas de DNA são extremamente promissoras, pois

permitem a ativação de ambos os tipos de respostas imunes, celular e humoral. Isto é possível somente porque os peptídeos antigênicos são sintetizados no citoplasma da célula eucariótica, podendo estes ser apresentados ao sistema imune pelas moléculas de MHC de classe I facilitando a indução de respostas imunes celulares¹. Neste contexto, o desenvolvimento de vacinas de DNA será de extrema importância para proteção contra patógenos intracelulares que causam infecções crônicas e que possuem longos períodos de incubação, dado que a resposta imunológica celular é essencial para a eliminação destes microrganismos. As vacinas de DNA são relativamente fáceis e rápidas de serem produzidas, sem a necessidade de cultivo do patógeno, o que teoricamente as tornam mais adequadas para prevenção de novas doenças emergentes¹⁰.

1.3 Adjuvantes E Estratégias De Reforço Imunizante

Uma das limitações das vacinas recombinantes é que não induzem uma resposta tão forte quanto as vacinas atenuadas. Portanto, diversos estudos investigam o uso de adjuvantes, ou seja, moléculas que quando administradas juntas com o antígeno intensificam a indução da resposta imune¹¹. Para o uso de vacinas de subunidades proteicas, os sais de alumínio têm sido bastante utilizados, embora seu mecanismo ainda seja pouco conhecido¹. Para o caso das vacinas de DNA a administração conjunta de plasmídeos portando genes de interleucinas, tais como IL-12, IL-15 e IL 7 que medeiam a atividade de células apresentadoras de antígeno, tem se apresentado como estratégia promissora¹².

Ademais, muitas vacinas requerem a imunização com duas ou mais doses para aumentar o tempo de permanência do antígeno no organismo. Este é um processo conhecido como regime de reforço ou “*prime-boost*”¹³. As vacinas com formulações idênticas usadas em ambas as doses, inicial e de reforço, são consideradas como regime de *prime-boost* homólogo. Em contraste, quando formulações diferentes são aplicadas, denomina-se como regime heterólogo. Ainda que por motivos não totalmente esclarecidos, estudos da literatura científica tem relatado resultados mais eficientes com a utilização de regimes heterólogos, especialmente contra patógenos intracelulares. Acredita-se que seja devido a uma intensificação de estímulo da imunidade celular, levando a uma ativação de uma resposta antígeno específica mais

eficaz ⁶. Neste contexto, a utilização de vacinas de DNA tem sido sugeridas como ótimas candidatas para o processo de “*priming*”, já que elas induzem resposta mediadas por células T na primeira dose em protocolos de imunização⁹.

1.4 Vetorização de Vacinas de DNA

Existem diversas barreiras que limitam a entrada do DNA plasmidial na célula alvo, entre elas destaca-se o meio extracelular, onde ele pode ser digerido pelas nucleases, que desempenham importante função na defesa contra infecções por ácidos nucleicos exógenos¹⁴. Para lidar com estes desafios, os pesquisadores têm tentado desenvolver diferentes métodos de entrega. A biobalística ou “*gene gun*” é um método clássico utilizado para aumentar a eficiência da entrega de vacinas de DNA pela via intradérmica pelo bombardeio de partículas de ouro revestidas com moléculas do DNA codificador do antígeno vacinal ¹⁵. Outras abordagens que tem sido bastante utilizadas incluem a eletroporação e a iontoforese que utilizam campos elétricos para a formação de poros nas membranas celulares, facilitando a entrada do DNA na célula. A nanotecnologia tem contribuído bastante para a administração de vacinas, como através da utilização de vetores virais como o uso de retrovírus e adenovírus¹⁶.

Neste contexto, o uso de bactérias como veículo de entrega de vacinas de DNA ou proteínas recombinantes tem se apresentado como uma alternativa atraente. Os tópicos abaixo irão abordar os principais estudos, destacando-se os avanços mais recentes. Adicionalmente, o leitor irá encontrar uma descrição dos tecidos linfoides associados a mucosas do trato gastrointestinal, dado que estas vias possuem características imunológicas específicas que conferem diversas vantagens para a utilização de vetores bacterianos em relação a outras estratégias vacinais.

2. VETORES BACTERIANOS E TECIDOS LINFOIDES ASSOCIADOS À MUCOSA (MALTs)

O processo de vacinas de DNA envolve a administração direta do plasmídeo vacinal, que possui o gene codificador da proteína antigênica, a qual será produzida pelas células do hospedeiro, levando a geração de uma potencial resposta imune celular e produção de anticorpos.

No entanto, alguns problemas surgiram durante o desenvolvimento dessa abordagem de “imunização”¹⁷. Foi demonstrado que o método de administração usado inicialmente (intramuscular) era ineficiente para induzir resposta imune em animais de grande porte, como os humanos por exemplo, uma vez que o plasmídeo vacinal é mal distribuído e rapidamente degradado. Além disso, a vacina de DNA requer uma grande dose para induzir efetivamente a resposta do sistema imunológico, sendo necessário pelo menos 1-100 µg de DNA^{17,18}.

Considerando a desvantagem da injeção intramuscular, outras possíveis vias de administração têm sido estudadas sendo a utilização de bactérias vivas como veículo de entrega dessas vacinas de DNA uma das estratégias mais promissoras. Assim, diferente do sistema de expressão heteróloga de proteínas, nas quais a bactéria carregando o plasmídeo é quem produz a proteína recombinante, na plataforma de vacina de DNA a bactéria servirá apenas como veículo de entrega para liberar o plasmídeo vacinal diretamente às células do hospedeiro, sendo estas as responsáveis por produzir a proteína que irá estimular o sistema imune do hospedeiro^{19,20}. Por exemplo, um plasmídeo contendo o gene da insulina humana pode ser inserido dentro de uma bactéria, mas a bactéria não irá produzir essa proteína. A bactéria servirá apenas como veículo de entrega para liberar esse plasmídeo diretamente às células do hospedeiro, que por sua vez irão produzir a insulina.

Os vetores plasmidiais comercialmente disponíveis aprovados para terapia gênica e vacinação incluem o pVax1, pVAC, pDNAVACultra, pcDNA, dentre outros. No entanto é interessante ressaltar que embora a vacina de DNA seja promissora, nenhuma vacina de DNA foi aprovada para uso em humanos até o momento. Isso se deve ao fato de que há ainda algumas preocupações em relação à essa nova metodologia, como integração do plasmídeo vacinal ao genoma do hospedeiro, aumentando assim o risco de mutagênese e surgimento de cânceres, indução de respostas autoimunes, dentre outros^{21,22}.

Entre as principais rotas de administração dos vetores bacterianos contendo plasmídeos vacinais destaca-se as vias de mucosas. A administração das vacinas por via de mucosas é baseada nas propriedades do tecido linfoide associado a mucosa (MALT). Encontrado em várias áreas da superfície da mucosa, o MALT tem como principal função prevenir a entrada de um enorme número de microrganismos

patogênicos e não patogênicos no organismo, sendo este efeito relacionado a produção e secreção de alguns componentes do sistema imunológico como a imunoglobulina A (sIgA) e diferentes citocinas (proteínas capazes de afetar a função de outras células e, até mesmo, daquelas que as produzem)^{23,24}.

De acordo com a região anatômica, o MALT pode ser subdividido em tecido linfóide associado ao intestino (GALT), o tecido linfóide associado ao nariz (NALT) e o tecido linfóide associado aos brônquios (BALT), entre outros. A maior parte do MALT humano é constituída pelo tecido linfóide associado ao intestino (GALT), que contém alguns componentes celulares importantes como as Placas de Peyer (PPs) (nódulos linfóides indutores de reposta imune). Nas PPs podem ser encontradas células imunes como as células B (produtoras de IgA), as células microfold (M) (células epiteliais especializadas que atuam no transporte de microrganismos ou partículas antigênicas através da camada de células epiteliais para dentro da PPs, onde as interações com as células imunes podem ocorrer), as células dendríticas (que atuam na fagocitose e apresentação de antígenos), e as células T (células efetoras da resposta imune através da produção de citocinas)^{25,26}.

Os mecanismos pelos quais o plasmídeo vacinal é transferido dos vetores bacterianos vivos para as células eucarióticas ainda não são bem compreendidos. No entanto, a partir de algumas hipóteses obtidas a partir de estudos *in vitro*, acredita-se que após ser administrada por via oral, as bactérias carreando o plasmídeo vacinal entram em contato com a superfície intestinal, onde são reconhecidas por células epiteliais intestinais, como as células Microfold (Células M) ou células imunes como as células dendríticas (DC), usando receptores moleculares de reconhecimento específicos presentes nas bactérias. Após esse reconhecimento, as bactérias são fagocitadas, e sua posterior lise libera o plasmídeo vacinal no citoplasma da célula intestinal. Esse plasmídeo então migra para o núcleo da célula do hospedeiro onde o gene será transcrito e a proteína será produzida, usando a maquinaria de transcrição e tradução do hospedeiro. Após essa etapa, a proteína (antígeno) produzida é clivada, e suas partículas (peptídeos) podem ser apresentados por células apresentadoras de antígenos (como as DC) ao complexo MHC de classe I presente em outras células, de forma a ativar a resposta imune por meio das células T citotóxicas (CD8+). Por outro lado, a proteína produzida pode ser secretada e apresentada pelo complexo MHC de

classe II presente em macrófagos, células dendríticas ou células B, de forma a ativar a produção de anticorpos e/ou células T auxiliar (CD4+). Portanto, o plasmídeo vacinal pode induzir a produção tanto de respostas imunes celulares como sistêmicas^{19,27,28}.

Os primeiros vetores bacterianos vivos foram construídos a partir de microrganismos patogênicos como *Salmonella enterica* ser. typhi, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexnery* e *Yersinia enterocolitica*, devido a maioria deles serem bem adaptadas ao ambiente da superfície da mucosa durante seu processo natural de infecção (Lin et al., 2015). Por exemplo, *Y. enterocolitica* foi usado como veículo de entrega de uma vacina de DNA que codifica o antígeno bacterioferritina de *Bacillus abortus*²⁹. *S. flexnery* entregou com sucesso a vacina de DNA que codifica o gene *gag* do HIV³⁰. Por sua vez, *L. monocytogenes* foi utilizado como vetor bacteriano para entrega de uma vacina de DNA expressando uma ampla gama de antígenos virais e tumorais, incluindo a proteína E7 do papilomavírus humano (HPV16) associado ao câncer de colo de útero, cabeça e pescoço³¹. *S. enterica* serovar typhimurium recombinante também foi usada como veículo de entrega contendo um plasmídeo vacinal para o gene *Flk-1* [que codifica o receptor 2 do fator de crescimento epitelial vascular (VEGRF2) em camundongos] e cujos efeitos positivos foram relatados na aterosclerose em modelo murino³². A partir da utilização desses vetores nesses modelos experimentais foi possível observar a indução da resposta imune.

Deve-se ressaltar que essas linhagens são utilizadas para tal finalidade somente após serem atenuadas ou inativadas antes de serem administradas. No entanto, esses microrganismos apresentam um risco residual de reversão ao fenótipo patogênico, não sendo totalmente seguros para utilização em humanos, principalmente em pessoas com baixa imunidade e crianças³³. Nesse contexto, de forma a evitar tal problema, tem se investigado a utilização de bactérias não patogênicas como veículos de entrega de vacinas de DNA. Entre essas bactérias destacam-se as Bactérias Láticas (BL)²⁸.

3. BACTÉRIAS LÁTICAS COMO VETORES DE VACINA

As Bactérias Láticas (BL) constituem um grupo heterólogo de microrganismos gram-positivos, não patogênicos, ácido-tolerantes, apresentam metabolismo fermentativo, capazes de fermentar carboidratos para formar ácido lático, e

candidatas promissoras para o desenvolvimento de sistemas de produção de vacinas e distribuição de proteínas heterólogas de forma eficiente e segura³⁴⁻³⁶. O grupo das BL inclui várias espécies do gênero *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* e *Weissella*, agrupadas segundo características fenotípicas tradicionais, como a morfologia das colônias e das células, características bioquímicas e fisiológicas^{37,38}.

A maioria das BL são classificadas como probióticas e reconhecidas como seguras para nutrição humana recebendo o status GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pela United States Food and Drug Administration (FDA), e também cumpre os critérios de Presunção de Segurança Qualificada (QPS) desenvolvido pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), sendo comumente usada para fermentação na indústria de alimentos e como suplementos alimentares probióticos devido aos seus efeitos benéficos à saúde³⁹. Os efeitos benéficos das cepas das BL reconhecidas como probióticas diferem em suas atividades. Alguns benefícios incluem regulação da composição da microbiota intestinal, capacidade de aderência, melhora na função de barreira da mucosa, inibição do crescimento de outros microrganismos patogênicos e, modulação do sistema imunológico do hospedeiro, aumentando a barreira intestinal contra antígenos^{40,41}.

Devido à sua inocuidade e facilidade de manipulação juntamente com os importantes avanços nas últimas décadas nas áreas de genética e sistemas de expressão, a utilização de *Lactococcus lactis*, vem sendo expandida para diversas aplicações em novas áreas como sua utilização como “usinas celulares” para a produção de moléculas tanto de interesse econômico quanto médico e biotecnológico e também para a produção de vacinas vivas de mucosas para entrega de proteínas terapêuticas ou imunogênicas, enzimas e antígenos à superfície das mucosas pela via oral^{37,42}, revelando uma gama de aplicações promissoras para esse microrganismo^{34,43}.

Embora nenhuma das vacinas de DNA esteja aprovada para uso em humanos, estudos em animais e testes pré-clínicos mostraram que as BL podem ser candidatas vacinais promissoras para utilização no futuro. Dentre as vantagens em usar BL como vetores vacinais, está a capacidade de sobreviver à passagem pelo ácido gástrico e crescer no intestino, reforçar os efeitos de longo prazo das vacinas-alvo, além de

possuir altos níveis de expressão de antígenos^{34,42,44}. Finalmente, as BL são facilmente cultivadas, facilitando a produção em grande escala de vacinas.

A distribuição de vacinas da mucosa mediada por BL recombinante, particularmente via imunização intranasal ou oral, é mais aplicável e conveniente do que a injeção intramuscular de vacinas sistêmicas tradicionais⁴⁵. A administração de cepas de BL por via oral, intranasal ou genital pode estimular respostas imunológicas tanto de mucosas quanto sistêmicas, devido a capacidades imunomoduladoras e de produção de IgA secretora^{34,46}.

Algumas cepas de BL probióticas, desempenham atividade essencial na modulação do sistema imunológico, proporcionando proteção contra antígenos invasores, características relatadas em várias espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*⁴⁷. Os efeitos imunomoduladores das BL abrangem a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, o que sugere um mecanismo imunoregulatório intrínseco, através do estímulo a produção de IL-10 e células T reguladoras (Treg), que resulta em respostas imunológicas de mucosa⁴⁸. Exercem relevantes efeitos na imunidade inata por aumentar a citotoxicidade das células *Natural Killer* e a fagocitose de macrófagos, e a atividade mediada que leva a resposta imunológica adaptativa está associada a interação com os enterócitos, células dendríticas, Th1 e Th2⁴⁹.

O isolamento de novas cepas probióticas e a investigação de seus efeitos imunomoduladores em seres humanos e animais permanecem um assunto de grande interesse. Os resultados observados em ensaios randomizado controlado indicam que vários fatores podem estar envolvidos na associação entre a administração de BL como vetores vacinais e a atenuação observada quanto a expressão de antígenos e replicação viral no intestino delgado, em estudos com rotavírus (RV)⁴⁷, e Norovírus humano (HuNoV)³⁴. Essencialmente, a administração de BL pode induzir uma diminuição na secreção de IFN- γ , IL-17, e TNF α , enquanto que um aumento da produção de IL-10 devido a um enriquecimento da população de células TCD4+CD25+^{50,51}.

Esta estratégia de vacinação a partir de BL é particularmente atraente, uma vez que uma vacina ideal deve ser segura, estável, barata, e de fácil administração e capaz

de induzir respostas imunes humorais, celulares e de mucosa robustas em locais onde os patógenos interagem com o hospedeiro.

4. *Lactococcus lactis* COMO MODELO DE VETOR VACINAL

4.1 Expressão De Proteínas Heterólogas

Lactococcus lactis pode ser projetada como uma fábrica de produção de proteínas de interesse biotecnológico e oferece vantagens em relação a outras bactérias utilizadas para esse fim por ser um microrganismo seguro, de fácil manipulação e livre de LPS, o que facilita a etapa de purificação, uma vez que o LPS é um potente ativador inflamatório. Sendo a bactéria láctica modelo, diversos sistemas de expressão foram desenvolvidos explorando diferentes características do metabolismo de *L. lactis*. Além disso, alguns são induzíveis, com a vantagem de que podem ser “ligados” e “desligados”.

O sistema NICE (*Nisin-controlled expression system*) foi desenvolvido utilizando o promotor P_{nisA} do gene que codifica o peptídeo antimicrobiano nisina, produzido por *L. lactis*⁵². Este peptídeo se liga em receptores lipídicos de bactérias, levando a formação de poros e consequente vazamento de moléculas, o que leva a célula à morte⁵³. A síntese da nisina depende de que o peptídeo se ligue ao gene NisK, fosforilando o gene NisR que ativa o promotor P_{nisA} e P_{nisF} , outro gene envolvido na imunidade contra nisina. Desta maneira, o gene da proteína de interesse deve ser clonado após o promotor P_{nisA} (no sentido 3') para ser expresso, e a expressão da proteína se dará pela adição de nisina ao meio de cultura bacteriano. Assim, cientistas isolaram os genes NisK e NisR e inseriram no cromossomo da cepa *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363, criando a cepa *L. lactis* NZ9000 e adicionalmente, plasmídeos foram construídos abrigando este sistema para serem utilizados nas bactérias. A funcionalidade do sistema NICE foi demonstrada em *L. lactis* por meio da clonagem do gene de lisoestafina, uma metaloendopeptidase de *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus* em um vetor plasmideano com o sistema NICE, e após indução com nisina, a produção da enzima foi detectada na fração solúvel do citoplasma bacteriano⁵⁴.

O sistema ACE (*Agmatine-controlled expression system*) deriva de um *cluster* gênico de *L. lactis* subsp. *cremoris* CECT8666 envolvido na via de biossíntese de putrescina, onde a proteína reguladora AguR detecta concentrações extracelulares de agmatina e ativa o promotor P_{aguB}, que ativa o operon *aguBDAC*⁵⁵. Sendo assim, a ativação do sistema pACE se dá pela adição de agmatina ao meio de cultura. O sistema foi demonstrado como efetivo quando *L. lactis* NZ9000 foi capaz de expressar prolilendopeptidase de *Myxococcus xanthus* após indução com agmatina⁵⁶.

O sistema de expressão induzível por xilose (XIES, *Xylose-inducible expression system*) foi desenvolvido utilizando o promotor *xylT* de *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118, parte do operon de xilose bacteriano, onde a adição de xilose ao meio de cultura bacteriano induz a expressão da proteína de interesse, a ser clonada após o promotor. A versão secretada do vetor (pXyl:SEC) contém um peptídeo sinal da proteína Usp45, secretada por *L. lactis*, que permite o endereçamento da proteína de interesse para secreção pela célula⁵⁷. O vetor também contém o gene repórter nuclease, de *Staphylococcus aureus*. O gene Hsp65 de *Mycobacterium leprae* foi introduzido no sistema XIES em ambas as suas formas citoplasmática (pXylt:CYT:hsp65) e secretada (pXylt:SEC:hsp65), livre de endotoxinas ou produtos de degradação proteica⁵⁸.

Explorando a afinidade e a captação de íons metálicos por *L. lactis*, um sistema foi desenvolvido utilizando o promotor P_{Zn} e o gene regulador *zitR* em um vetor, criando o sistema pZn*zitR*, onde a ausência de zinco no meio ativa o sistema e a presença de Zn²⁺ o reprime pela ligação do íon ao gene *zitR*⁵⁹. A depleção de zinco no meio de cultura bacteriano pode ser facilmente alcançada adicionando-se um agente quelante como EDTA, ou de madeira gradual, acompanhando o crescimento bacteriano⁶⁰.

O sistema p170 explora um promotor natural de *L. lactis* que transcreve o gene *orfX* cuja função se desconhece, mas é detectado quando há depleção de nutrientes e acidificação do ambiente bacteriano⁶¹.

Como alternativa aos sistemas em que é necessário adicionar substâncias ao meio, o sistema SICE (*Stress-induced controlled expression*) utiliza o operon *groESL* de *L. lactis* que codifica as chaperoninas GroES e GroEL em resposta ao estresse⁶². Assim, este sistema é ativado quando a bactéria encontra radiação UV, pH baixo no

meio ou choque térmico. Portanto, o sistema SICE é uma alternativa para quando se deseja que proteína de interesse seja expressa e entregue nas mucosas ao encontrar condições estressantes durante sua passagem pelo trato gastrointestinal⁶³.

4.2 Vacinas de DNA

Durante anos, bactérias patogênicas foram utilizadas para entregar vacinas de DNA a tecidos-alvo em hospedeiros, mas há o risco em potencial de reversão ao fenótipo selvagem. Com os recentes avanços nas modificações genéticas e considerando as diversas vantagens de se utilizar bactérias lácticas e, principalmente, seu organismo modelo *L. lactis*, a entrega de vacinas de DNA por *L. lactis* destaca-se como uma alternativa, uma vez que garante a entrega à célula hospedeira e induz uma resposta imune devido às características bacterianas, já que vacinas de DNA possuem baixa imunogenicidade¹⁹. Além disso, a via oral de entrega é preferível, uma vez que induz a produção de resposta imune de mucosa além da sistêmica, e uma vez que ao chegar à mucosa intestinal, a bactéria é reconhecida por enterócitos, células M e dendríticas²⁸. Alguns vetores vacinais foram desenvolvidos e utilizados em *L. lactis* em diversos estudos.

pPERDBY é um plasmídeo vacinal que contém um cassete de expressão eucariótico que contém o promotor de citomegalovírus pCMV, um sítio múltiplo de clonagem, que contém sequências de diversas enzimas de restrição para inserção por clonagem molecular do antígeno de interesse, fusionado à sequência que codifica o gene repórter *GFP* (*green fluorescent protein*) e uma sequência de poliadenilação⁶⁴. A funcionalidade de pPERDBY e a entrega pelo veículo bacteriano foi demonstrada *in vitro* quando esse plasmídeo foi transformado em *L. lactis* que, por sua vez, foram co-cultivadas com células Caco-2, e a expressão de GFP detectada de 24 a 72 horas após co-incubação⁶⁵.

O vetor pValac também possui o pCMV, um sítio múltiplo de clonagem e um sinal de poliadenilação para tradução proteica. Como muitos plasmídeos, contém uma origem de replicação para *E. coli* mas também uma para *L. lactis* e resistência ao antibiótico cloranfenicol, que serve para a seleção de colônias positivas para o vetor⁶⁶. Quando pValac:il-10 foi transformado em *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺, uma cepa que consegue invadir as células hospedeiras, e testado em um modelo murino de colite

ulcerativa com administração oral, animais apresentaram melhora na inflamação intestinal, apresentando uma imunomodulação provocada pelo aumento da citocina anti-inflamatória IL10⁶⁷.

O vetor pEXU foi desenvolvido também como vetor vacinal, contendo pCMV, sítio múltiplo de clonagem, sinal de poliadenilação (BGH polyA), uma origem teta de replicação para *E. coli* e para *L. lactis* e um gene de resistência a eritromicina para seleção de clones positivos⁶⁸. pEXU portando a *orf* de GFP como gene repórter foi transformado em *L. lactis* MG1363, que foi co-cultivada com células Caco-2 e a expressão da proteína fluorescente detectada. Em uma avaliação *in vivo* da estratégia de entrega do vetor vacinal por *L. lactis*, a expressão de GFP foi detectada no cólon de animais que receberam a bactéria recombinante por via oral⁶⁸.

Diversos estudos também já relataram o papel de *L. lactis* como vetor vacinal. Uma cepa de *L. lactis* geneticamente modificada para expressar domínios das proteínas TcdA e TcdB de *C. difficile* foi capaz de elicitar anticorpos neutralizantes contra a infecção desta bactéria quando administrada por via oral em camundongos⁶⁹. Similarmente, utilizando o sistema NICE, *L. lactis* induziu níveis de sIgA, IgG, anticorpos neutralizantes e proliferação linfocitária contra o vírus FMD em camundongos⁷⁰. A imunização de mucosas em camundongos com *L. lactis* NZ9000 contendo a proteína UreB de *Helicobacter pylori* fusionada com a citocina IL-2 induziu proteção por meio da produção de anticorpos contra a infecção pelo patógeno. Ampliando as estratégias terapêuticas, com o objetivo de atenuar inflamação intestinal, *L. lactis* pValac:il-10 se revelou capaz de entregar o plasmídeo levando as células do hospedeiro a produzirem a citocina anti-inflamatória IL10 e assim, atenuar a inflamação intestinal em um modelo animal de doença de Crohn⁷¹.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A geração de alternativas mais eficientes de vacinas, com aumento da resposta imunológica e redução de efeitos secundários, tem levado a uma busca constante. O uso de bactérias lácticas para entrega de vacinas vem sendo extensamente estudado nos últimos anos obtendo resultados satisfatórios. Desse modo, é possível afirmar que a utilização de bactérias lácticas, em especial o *L. lactis*, configura uma alternativa

viável, segura e eficiente para a entrega de vacinas de DNA e na produção heteróloga de antígenos.

REFERÊNCIAS

1. Pollard, A. J. & Bijker, E. M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat. Rev. Immunol.* **21**, 83–100 (2021). DOI: doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7
2. Zhang, L., Wang, W. & Wang, S. Effect of vaccine administration modality on immunogenicity and efficacy. *Expert Rev. Vaccines* **14**, 1509–1523 (2015). DOI: doi.org/10.1586/14760584.2015.1081067
3. Rodrigues, M. M. et al. Importance of CD8 T cell-mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implications for the development of effective vaccines. *An. Acad. Bras. Cienc.* **75**, 443–468 (2003).
4. Plotkin, S. A. Vaccines: facing complex problems with the promise of immunology. *Expert Rev. Vaccines* **13**, 939–941 (2014). DOI: doi.org/10.1586/14760584.2014.934678
5. Levine, M. M. & Sztein, M. B. Vaccine development strategies for improving immunization: the role of modern immunology. *Nat. Immunol.* **5**, 460–464 (2004). DOI: doi.org/10.1038/ni0504-460
6. Nascimento, I. P. & Leite, L. C. C. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **45**, 1102–1111 (2012). DOI: doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500142
7. Gunasekaran, B. & Gothandam, K. M. A review on edible vaccines and their prospects. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **53**, (2020). DOI: doi.org/10.1590/1414-431X20198749
8. Vargas-Cortez, T., Morones-Ramirez, J. R., Balderas-Renteria, I. & Zarate, X. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli* tagged with the fusion protein CusF3H+. *Protein Expr. Purif.* **132**, 44–49 (2017). DOI: doi.org/10.1016/j.pep.2017.01.006
9. Kutzler, M. A. & Weiner, D. B. DNA vaccines: ready for prime time? *Nat. Rev. Genet.* **9**, 776–788 (2008). DOI: doi.org/10.1038/nrg2432
10. Rauch, S., Jasny, E., Schmidt, K. E. & Petsch, B. New Vaccine Technologies to Combat Outbreak Situations. *Front. Immunol.* **9**, (2018). DOI: doi.org/10.3389/fimmu.2018.01963
11. Abhyankar, M. M. et al. Adjuvant composition and delivery route shape immune response quality and protective efficacy of a recombinant vaccine for *Entamoeba histolytica*. *npj Vaccines* **3**, 22 (2018). DOI: doi.org/10.1038/s41541-018-0060-x
12. Stevceva, L., Moniuszko, M. & Grazia Ferrari, M. Utilizing IL-12, IL-15 and IL-7 as Mucosal Vaccine Adjuvants. *Lett. Drug Des. Discov.* **3**, 586–592 (2006). DOI: doi.org/10.2174/157018006778194655
13. Valdés, I., Lazo, L., Hermida, L., Guillén, G. & Gil, L. Can Complementary Prime-Boost Immunization Strategies Be an Alternative and Promising Vaccine Approach Against Dengue Virus? *Front. Immunol.* **10**, (2019). DOI: doi.org/10.3389/fimmu.2019.01956

14. Hartmann, G. Nucleic Acid Immunity. in Alt, Frederick W. *Advances in Immunology*. Academic Press, 121–169 (2017). DOI: doi.org/10.1016/bs.ai.2016.11.001.
15. Oliveira, S. C. et al. Immunological properties of gene vaccines delivered by different routes. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 32, 207–214 (1999).
16. Goyal, A. K., Rath, G. & Garg, T. Nanotechnological Approaches for Genetic Immunization in DNA and RNA Nanobiotechnologies in *Medicine: Diagnosis and Treatment of Diseases* 67–120 (Springer Berlin Heidelberg, 2013). DOI: doi.org/10.1007/978-3-642-36853-0_4
17. Wang, S. et al. The relative immunogenicity of DNA vaccines delivered by the intramuscular needle injection, electroporation and gene gun methods. *Vaccine* 26, 2100–2110 (2008). DOI: doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.02.033
18. Denis-Mize, K. S. et al. Mechanisms of increased immunogenicity for DNA-based vaccines adsorbed onto cationic microparticles. *Cell. Immunol.* 225, 12–20 (2003). DOI: doi.org/10.1016/j.cellimm.2003.09.003
19. Yurina, V. Live Bacterial Vectors—A Promising DNA Vaccine Delivery System. *Med. Sci.* 6, 27 (2018). DOI: doi.org/10.3390/medsci6020027
20. Ding, C., Ma, J., Dong, Q. & Liu, Q. Live bacterial vaccine vector and delivery strategies of heterologous antigen: A review. *Immunol. Lett.* 197, 70–77 (2018). DOI: doi.org/10.1016/j.imlet.2018.03.006
21. Saade, F. & Petrovsky, N. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 11, 189–209 (2012). DOI: doi.org/10.1586/erv.11.188
22. FDA. Recommendations for microbial vectors used for gene therapy guidance for industry. *Fed. Regist.* 81, 63766–63767. (2016).
23. Cesta, M. F. Normal Structure, Function, and Histology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. *Toxicol. Pathol.* 34, 599–608 (2006). DOI: doi.org/10.1080/01926230600865531
24. Brandtzaeg, P. Function of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue in Antibody Formation. *Immunol. Invest.* 39, 303–355 (2010). DOI: doi.org/10.3109/08820131003680369
25. Spahn, T. W. Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. *Gut* 53, 456–465 (2004). DOI: dx.doi.org/10.1136/gut.2003.023671
26. Mörbe, U. M. et al. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunol.* 14, 793–802 (2021). DOI: doi.org/10.1038/s41385-021-00389-4
27. de Azevedo, M. et al. Recombinant invasive *Lactococcus lactis* can transfer DNA vaccines either directly to dendritic cells or across an epithelial cell monolayer. *Vaccine* 33, 4807–4812 (2015). DOI: doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.077
28. Tavares, L. M. et al. Novel strategies for efficient production and delivery of live biotherapeutics and biotechnological uses of *Lactococcus lactis*: the Lactic Acid Bacterium model. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 1–19 (2020). DOI: doi.org/10.3389/fbioe.2020.517166.
29. Al-Mariri, A. et al. *Yersinia enterocolitica* as a Vehicle for a Naked DNA Vaccine Encoding *Brucella abortus* Bacterioferritin or P39 Antigen. *Infect. Immun.* 70, 1915–1923 (2002). DOI: doi.org/10.1128/IAI.70.4.1915-1923.2002

30. Xu, F. Immunogenicity of an HIV-1 gag DNA vaccine carried by attenuated *Shigella*. *Vaccine* 21, 644–648 (2003). DOI: doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00573-X
31. Gunn, G. R. et al. Two *Listeria monocytogenes* Vaccine Vectors That Express Different Molecular Forms of Human Papilloma Virus-16 (HPV-16) E7 Induce qualitatively Different T Cell Immunity That Correlates with Their Ability to Induce Regression of Established Tumors Immortal. *J. Immunol.* 167, 6471–6479 (2001). DOI: doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6471
32. Petrovan, R. J., Kaplan, C. D., Reisfeld, R. A. & Curtiss, L. K. DNA Vaccination Against VEGF Receptor 2 Reduces Atherosclerosis in LDL Receptor-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1095–1100 (2007). DOI: doi.org/10.1161/ATVBAHA.106.139246
33. Daudel, D., Weidinger, G. & Spreng, S. Use of attenuated bacteria as delivery vectors for DNA vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 6, 97–110 (2007). DOI: doi.org/10.1586/14760584.6.1.97
34. Craig, K. et al. A Lactic Acid Bacteria (LAB)-Based Vaccine Candidate for Human Norovirus. *Viruses* 11, 213 (2019). DOI: doi.org/10.1016/bs.ai.2016.11.001
35. Szatraj, K., Szczepankowska, A. K. & Chmielewska-Jeznach, M. Lactic acid bacteria - promising vaccine vectors: possibilities, limitations, doubts. *J. Appl. Microbiol.* 123, 325–339 (2017). DOI: doi.org/10.1111/jam.13446
36. Tavares, L. M. et al. Novel strategies for efficient production and delivery of live biotherapeutics and biotechnological uses of *Lactococcus lactis*: the Lactic Acid Bacterium model. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 1–19 (2020). DOI: doi.org/10.3389/fbioe.2020.517166.
37. Bermúdez-Humarán, L. G. & Langella, P. Utilisation des bactéries lactiques comme vecteurs vaccinaux. *Rev. Francoph. des Lab.* 2009, 79–89 (2009). DOI: doi.org/10.1016/S1773-035X(09)70312-0
38. Rotta, I. S., Da Matta, M. F., Dos Santos, C. T. B., Paiva, A. D. & Ferreira Machado, A. B. Bactérias do ácido láctico potencialmente probióticas isoladas de leite não pasteurizado. *Rev. do Inst. Laticínios Cândido Tostes* 75, 178–189 (2020). DOI: doi.org/10.14295/2238-6416.v75i3.820
39. Coelho-Rocha, N. D. et al. Microencapsulation of Lactic Acid Bacteria Improves the Gastrointestinal Delivery and in situ Expression of Recombinant Fluorescent Protein. *Front. Microbiol.* 9, (2018). DOI: doi.org/10.3389/fmicb.2018.02398
40. Vilander & Dean. Adjuvant Strategies for Lactic Acid Bacterial Mucosal Vaccines. *Vaccines* 7, 150 (2019). DOI: doi.org/10.3390/vaccines7040150
41. Wszyńska, A., Kobińska, P., Bardowski, J. & Jagusztyn-Krynicka, E. K. Lactic acid bacteria—20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 2967–2977 (2015). DOI: doi.org/10.1007/s00253-015-6498-0
42. Wang, H., Geier, M. S. & Howarth, G. S. Prebiotics: A Potential Treatment Strategy for the Chemotherapy-damaged Gut? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 946–956 (2016). DOI: doi.org/10.1080/10408398.2012.741082
43. Wells, J. M. & Mercenier, A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 349–362 (2008). DOI: doi.org/10.1038/nrmicro1840

44. Trombert, A. Recombinant lactic acid bacteria as delivery vectors of heterologous antigens: the future of vaccination? *Benef. Microbes* 6, 313–324 (2015). DOI: doi.org/10.3920/BM2014.0068
45. Kim, S. H. et al. Lactic acid bacteria improves Peyer's patch cell-mediated immunoglobulin a and tight-junction expression in a destructed gut microbial environment. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1035–1045 (2016). DOI: doi.org/10.4014/jmb.1512.12002
46. Wang, M., Gao, Z., Zhang, Y. & Pan, L. Lactic acid bacteria as mucosal delivery vehicles: a realistic therapeutic option. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 5691–5701 (2016). DOI: doi.org/10.1007/s00253-016-7557-x
47. Afchangi, A., Latifi, T., Jalilvand, S., Marashi, S. M. & Shoja, Z. Combined use of lactic-acidproducing bacteria as probiotics and rotavirus vaccine candidates expressing virus-specific proteins. *Arch. Virol.* 166, 995–1006 (2021). DOI: doi.org/10.1007/s00705-021-04964-9
48. Nataraj, B. H., Ali, S. A., Behare, P. V. & Yadav, H. Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microb. Cell Fact.* 19, 168 (2020). DOI: doi.org/10.1186/s12934-020-01426-w
49. Vilander, A. C. & Dean, G. A. Adjuvant Strategies for Lactic Acid Bacterial Mucosal Vaccines. *Vaccines* 7, (2019). DOI: doi.org/10.3390/vaccines7040150
50. Villena, J. & Kitazawa, H. Editorial: Immunobiotics—Interactions of Beneficial Microbes with the Immune System. *Front. Immunol.* 8, (2017). DOI: doi.org/10.3389/fimmu.2017.01580
51. Abdo, Z. et al. Impact of oral probiotic *Lactobacillus acidophilus* vaccine strains on the immune response and gut microbiome of mice. *PLoS One* 14, e0225842 (2019). DOI: doi.org/10.1371/journal.pone.0225842
52. Mierau, I. & Kleerebezem, M. 10 Years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 705–717 (2005). DOI: doi.org/10.1007/s00253-005-0107-6
53. Hasper, H. E., De Kruijff, B. & Breukink, E. Assembly and stability of nisin-Lipid II pores. *Biochemistry* 43, 11567–11575 (2004). DOI: doi.org/10.1021/bi049476b
54. Mierau, I. et al. Industrial-scale production and purification of a heterologous protein in *Lactococcus lactis* using the nisin-controlled gene expression system NICE: The case of lysostaphin. *Microb. Cell Fact.* 4, 1–9 (2005). DOI: doi.org/10.1186/1475-2859-4-15
55. Linares, D. M. et al. AguR, a transmembrane transcription activator of the putrescine biosynthesis operon in *Lactococcus lactis*, acts in response to the agmatine concentration. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6145–6157 (2015). DOI: doi.org/10.1128/AEM.00959-15
56. Linares, D. M. et al. Implementation of the agmatine-controlled expression system for inducible gene expression in *Lactococcus lactis*. *Microb. Cell Fact.* 14, 208 (2015). DOI: doi.org/10.1186/s12934-015-0399-x
57. Miyoshi, A. et al. A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 239, 205–212 (2004). DOI: doi.org/10.1016/j.femsle.2004.08.018
58. Del Carmen, S. et al. Evaluation of the anti-inflammatory effect of milk fermented by a strain of IL-10-producing *Lactococcus lactis* using a murine model of Crohn's disease. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 21, 138–146 (2012). DOI: doi.org/10.1159/000333830

59. Llull, D. & Poquet, I. New expression system tightly controlled by zinc availability in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5398–5406 (2004). DOI: doi.org/10.1128/AEM.70.9.5398-5406.2004
60. Llull, D. et al. *Lactococcus lactis* ZitR is a zinc-responsive repressor active in the presence of low, nontoxic zinc concentrations in vivo. *J. Bacteriol.* 193, 1919–1929 (2011). DOI: doi.org/10.1128/JB.01109-10
61. Madsen, S. M., Arnau, J., Vrang, A., Givskov, M. & Israelsen, H. Molecular characterization of the pH-inducible and growth phase-dependent promoter P170 of *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 32, 75–87 (1999). DOI: doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01326.x
62. Hartke, A., Frère, J., Boutibonnes, P. & Auffray, Y. Differential induction of the chaperonin GroEL and the co-chaperonin GroES by heat, acid, and uv-irradiation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Curr. Microbiol.* 34, 23–26 (1997). DOI: doi.org/10.1007/s002849900138
63. Benbouziane, B. et al. Development of a Stress-Inducible Controlled Expression (SICE) system in *Lactococcus lactis* for the production and delivery of therapeutic molecules at mucosal surfaces. *J. Biotechnol.* 168, 120–129 (2013). DOI: doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.04.019
64. Yagnik, B., Padh, H. & Desai, P. Construction of a new shuttle vector for DNA delivery into mammalian cells using non-invasive *Lactococcus lactis*. *Microbes Infect.* 18, 237–244 (2016). DOI: doi.org/10.1016/j.micinf.2015.11.006
65. Yagnik, B., Sharma, D., Padh, H. & Desai, P. In vivo delivery of pPERDBY to BALB/c mice by LacVax® DNA-I and comparison of elicited immune response with conventional immunization methods. *Gene Ther.* 25, 485–496 (2018). DOI: doi.org/10.1038/s41434-018-0033-8
66. Guimarães, V. et al. A new plasmid vector for DNA delivery using lactococci. *Genet. Vaccines Ther.* 7, 4 (2009). DOI: doi.org/10.1186/1479-0556-7-4
67. Souza, B. M. et al. *Lactococcus lactis* carrying the pValac eukaryotic expression vector coding for IL-4 reduces chemically-induced intestinal inflammation by increasing the levels of IL-10-producing regulatory cells. *Microb. Cell Fact.* 15, 150 (2016). DOI: doi.org/10.1186/s12934-016-0548-x
68. Mancha-Agresti, P. et al. A New Broad Range Plasmid for DNA Delivery in Eukaryotic Cells Using Lactic Acid Bacteria: In Vitro and In Vivo Assays. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 4, 83–91 (2017). DOI: doi.org/10.1016/j.omtm.2016.12.005
69. Guo, S. et al. The recombinant *Lactococcus lactis* oral vaccine induces protection against *C. difficile* spore challenge in a mouse model. *Vaccine* 33, 1586–1595 (2015). DOI: doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.02.006
70. Liu, X. et al. The immune response to a recombinant *Lactococcus lactis* oral vaccine against foot-and-mouth disease virus in mice. *Biotechnol. Lett.* 42, 1 (2020). DOI: doi.org/10.1007/s10529-020-02900-6
71. Zurita-Turk, M. et al. Attenuation of intestinal inflammation in IL-10 deficient mice by a plasmid carrying *Lactococcus lactis* strain. *BMC Biotechnol.* 20, 1–12 (2020). DOI: doi.org/10.1186/s12896-020-00631-0

CAPÍTULO 07

Vacinas Multiepítipo Usando Imunoinformática Em Bactérias, Vírus, Protozoários E Parasitos Patogênicos

Marcela Rezende Lemes¹; Andrei Giacchetto Felice²; Eduarda Guimarães Sousa³
Felipe Lucas Zen³; Ligia Carolina da Silva Prado⁴; Pedro Henrique Marques³
Rafael Destro Rosa Tiveron²; Thaís Cristina Vilela Rodrigues⁵;
Wylerson Guimarães Nogueira¹; Marcos Vinícius da Silva⁶;
Vasco Ariston de Carvalho Azevedo⁷; Siomar de Castro Soares⁶; Sandeep Tiwari⁴

¹ *Doutoranda em Bioinformática. Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG*

² *Mestrando em Ciências, ênfase em Parasitologia e Imunologia Aplicadas. Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Infectologia - UFTM*

³ *Graduanda do curso de Biomedicina. Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM.*

⁴ *Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.*

⁵ *Doutoranda no PPG em Genética, Depto de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG*

⁶ *Professor Adjunto do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM.*

⁷ *Professor Titular do Departamento de Genética, Ecologia e Evolução - Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG*

RESUMO

A imunoinformática, braço da bioinformática, permite a predição e construção de novas vacinas *in silico*, que podem ser produzidas e chegarem à população em geral. A partir do genoma dos organismos de interesse são feitas diferentes conversões e análises até se chegar à proteínas imunogênicas e que são compartilhadas entre diferentes espécies ou linhagens. Essas proteínas são então utilizadas para a produção de vacinas. Modelos vacinais *in silico* contra bactérias, vírus e parasitos já estão disponíveis, demonstrando o grande potencial da imunoinformática. No capítulo são abordados esses organismos com alguns dos avanços já alcançados.

Palavras-chave: Imunoinformática. Parasitos. Vírus. Bactérias. Vacinas.

1. INTRODUÇÃO

A bioinformática vem sendo usada para a produção de novas vacinas para o controle de doenças, espaço onde é chamada de imunoinformática. Apesar dos grandes avanços para o aceleração no desenvolvimento destas, muitas doenças ainda seguem sem opções novas de profilaxia (WI *et al.*, 2017).

Com a disponibilidade do sequenciamento de genoma completo ao final do séc. XX, a predição de antígenos *in silico* assumiu o foco dos estudos para o desenvolvimento de vacinas, em especial com o auxílio da bioinformática e o advento da Vacinologia Reversa (“reverse vaccinology” – RV (BAMBINI; RAPPUOLI, 2009). A RV analisa a sequência genômica de um patógeno, que é uma sequência codificada para todos os possíveis genes expressos ao longo do ciclo de vida de um agente patogênico (NAZ, Anam *et al.*, 2011). Além disso, o progresso na análise genômica, pangenômica, proteômica e transcriptômica surtiu um enorme impacto no modo com que novos antígenos estão sendo identificados (NAZ, Kanwal *et al.*, 2019; RAPPUOLI; ADEREM, 2011; RINAUDO *et al.*, 2009). Desde o primeiro trabalho em RV para o desenvolvimento de uma vacina, o conceito de vacinologia reversa também foi aplicado ao estudo de vários outros agentes causadores de doenças infecciosas (SARKAR *et al.*, 2021).

Além de vacinas, uma abordagem moderna chamada de “genômica subtrativa” está amplamente envolvida na identificação de novos e específicos alvos de drogas contra organismos patogênicos, como um passo para o reposicionamento ou desenvolvimento de novos fármacos (HOSSAIN *et al.*, 2017). Além disso, somados à genômica subtrativa, estudos *in silico* de *docking* molecular podem levar à descoberta de novos medicamentos para o tratamento de infecções (HOSSAIN *et al.*, 2017).

2. IMUNOINFORMÁTICA APLICADA A BACTÉRIAS

As bactérias são uma importante fonte de doenças, o que faz com que sejam grandes alvos dos estudos de imunoinformática. Dar H.A., *et al.*, realizou, em 2019, um pangenoma com 222 genomas completos da bactéria *Klebsiella pneumoniae*. Esse

microorganismo causa infecções nosocomiais, como por exemplo, pneumonia, bacteremia, endocardite e meningite, principalmente em pacientes imunocomprometidos (TUMBARELLO *et al.*, 2015) Dentro do genoma central do grupo estudado nesse trabalho, 4 proteínas apresentaram potenciais antigênicos para seguirem para análises de imunoinformática. Então, nove epítomos de células T, derivados de células B, foram unidos através de ligantes GPGPG e depois conjugados à toxina B do cólera, utilizada como adjuvante para melhorar a imunogenicidade (DAR *et al.*, 2019).

A bactéria *Moraxella catarrhalis*, um microrganismo Gram-negativo que causa infecções graves no trato respiratório e no ouvido médio em crianças e adultos (BERNHARD; SPANIOL; AEBI, 2012), foi estudada por Soltan *et al.*, já que o uso de antibióticos sem restrições tem aumentado as taxas de resistência a antimicrobianos, principalmente aqueles de primeira geração (PEREZ *et al.*, 2014). Através da utilização de alguns *softwares* de bioinformática, uma proteína de membrana externa, codificada pelo gene *BamA* e uma proteína de montagem de LPS, codificada pelo gene *LptD*, foram nomeadas como potenciais candidatas à uma vacina para a prevenção dessas infecções, após serem consideradas essenciais, virulentas, não homólogas à humanos e apresentarem alto índice de antigenicidade (SOLTAN *et al.*, 2021). O grupo fez a predição de epítomos de linfócitos T citotóxicos e auxiliares e de células B para confirmar se cobriam regiões conservadas das proteínas e sua alta antigenicidade.

Helicobacter pylori é outro microrganismo Gram-negativo com estudos dentro da área da imunoinformática. Essa bactéria é a principal causadora de inflamação gástrica crônica e responsável por aumentar o risco de câncer gástrico e o aparecimento de úlceras pépticas (PARSONNET, 1995). O tratamento dessa infecção inclui o uso de antibióticos e de inibidores da bomba de prótons por semanas. A grande quantidade de comprimidos e seus efeitos colaterais demonstra a importância da criação de uma vacina contra essa espécie (PARSONNET, 1995). Após avaliação das análises estruturais e do refinamento da estrutura de proteínas do banco de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI), três antígenos, HP0487, HP1453 e HP0906, que possuem uma alta localização e probabilidade de adesão e boa antigenicidade, sendo 0,57, 0,55 e 0,56, respectivamente (cut-off padrão de 0,51)

foram selecionados. Então, dois *softwares* avaliaram a alergenicidade, e HP1453 foi previsto como alérgeno, sendo excluído das etapas de predição de epítomos. Por fim, uma possível vacina contra *H. pylori* foi produzida *in silico* utilizando LT-IIc como adjuvante de mucosa, a proteína COMP, um antígeno protetor oipA, 5 epítomos de células B de HP0487 e HP0906, e um peptídeo ligante, que foram conectados via GPGPGPG, KFERQ e ligantes KK (NEZAFAT *et al.*, 2017).

Organismos Gram-positivos são estudados quando se trata da criação de vacinas, como no caso de *Staphylococcus aureus*, que é um patógeno oportunista e que pode ser encontrado principalmente na pele e em cavidades nasais (BROUILLETTE *et al.*, 2002), causando desde infecções leves até bacteremia e endocardite graves (SPELLBERG; DAUM, 2012). Em especial para essa bactéria, novos grupos de linhagens, chamadas de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA), este indicado como tratamento de última linha, surgiram como cepas super-resistentes a antibióticos e levaram a falhas nos tratamentos (HUANG; PLATT, 2003; SCHAFFER; LEE, 2008; STRANGER-JONES; BAE; SCHNEEWIND, 2006). Por um tempo, estudos focaram em encontrar alvos de vacinas relacionados a cápsula de polissacarídeo que protege o microrganismo (SOLTAN *et al.*, 2020), entretanto, com a imunoinformática, após predição de epítomos MHC-I e II e de células B, foram obtidas quatro regiões da proteína Enol, três regiões de ClfA e duas regiões de Isdb que, por fim, não foi considerada alérgica e tinha boa antigenicidade prevista pelos *softwares* Vaxijen e ANTIGENpro (HAJIGHAHRAMANI *et al.*, 2017).

De uma forma mais abrangente, um estudo avaliou as principais bactérias responsáveis pela meningite, como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* (ZAHROH *et al.*, 2016). A meningite afeta mais de 400 milhões de pessoas que vivem em uma área conhecida como “cinturão da meningite africana” e essas bactérias são responsáveis por causarem a maioria dos casos, sendo 45%, 18% e 14%, respectivamente; além de terem altas taxas de letalidade (QUAGLIARELLO; SCHELD, 1997; SHIN; KIM, 2012). Estudos avaliaram vacinas mais eficientes, como no caso de uma vacina multi-epítopo. Após selecionar sequências de proteínas dessas bactérias do NCBI, realizar a predição de epítomos de MHC I e II de células T e B foram realizadas, nas quais os epítomos

MQYGDKTTF, MKEQNTLEI, ECTEGEPDY e DLSIVVPIY para MHC classe I e YPMAMMWRNAS , TLQMTLLGIVPNLNK, ETSLHHIPGISNYFI e SLLYILEKNAEMEFD para MHC classe II, tiveram boa antigenicidade, boa afinidade com as moléculas de MHC e apresentaram em média 80% de cobertura populacional, sendo que para a população da Ásia Oriental, da América do Norte e da Europa, os valores foram acima dessa média (ZAHROH *et al.*, 2016).

3. IMUNOINFORMÁTICA APLICADA À INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS (ISTS)

Conforme descrito pela Organização Mundial da Saúde (OMS), um componente importante para o alcance da meta nº 03 da Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas (ONU) são as ações prioritárias de intervenção para o fim da epidemia de Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs) como problema de saúde pública (TRANSFORMING OUR WORLD: THE 2030 AGENDA FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT, 2018).

O termo IST é usado para se referir a uma condição transmitida de uma pessoa a outra por meio do contato sexual (SUBBARAO; AKHILESH, 2017), sendo as ISTs a principal causa global de doenças agudas, infertilidade, incapacidade de longo prazo e morte, com graves consequências médicas e psicológicas para milhões de homens, mulheres e crianças (DE WAURE *et al.*, 2015). Além disso, ISTs frequentemente resultam em estigmas, estereótipos, vulnerabilidade e têm sido associadas à violência de gênero (AMIN; MORENO, 2013). Segundo estimativa da OMS, em 2012 houve 357,4 milhões de novos casos globais de clamídia, gonorreia, sífilis e tricomoníase, o grupo das quatro ISTs curáveis mais comuns (NEWMAN *et al.*, 2015).

Apesar da alta incidência global de ISTs, estas continuam fazendo parte de uma área de pesquisa negligenciada, o que agrava a crise de saúde pública em todo o mundo (WI *et al.*, 2017). Portanto, a inclusão da imunoinformática nestas linhas de pesquisas se torna essencial para o combate a infecções emergentes multirresistentes e para os estudos e descobertas em novas medidas de tratamento e controle de ISTs, tais como vacinas e novos alvos de drogas.

O sucesso da aplicação da imunoinformática contra microrganismos desencadeou o surgimento de ensaios de produção de multiepítipos vacinais contra células cancerígenas (DEHBAREZ; NEZAFAT; MAHMOODI, 2020; HERRERA, 2021; SETIAWAN; RIZARULLAH, 2021). Contudo, muitos vírus podem propiciar a formação de tumores ou agravar a condição de imunocomprometidos, como de pacientes oncológicos. Para vários deles, ainda nenhuma vacina efetiva está disponível (RAPPUOLI *et al.*, 2021). Certos peptídeos virais são homólogos aos antígenos tolerogênicos associados a tumores. Porém, ao contrário destes, podem elicitar resposta pró-inflamatória (RAGONE *et al.*, 2021).

Muitos estudos objetivam melhorar a efetividade das vacinas contra HPV 6, 11, 16, 18, com novas formações de adjuvantes na cadeia polipeptídica ou a inclusão de epítipos de outras linhagens virais (ABBASIFARID *et al.*, 2021; NAMVAR *et al.*, 2021; PANAHI *et al.*, 2020; SANAMI *et al.*, 2021). No mesmo sentido, diversos constructos de multiepítipos de glicoproteínas da Família Herpesviridae, como de HVS-1/2 (DEGHANI; HASHEMPOUR; HASANSHAHI, 2019; RISINGER *et al.*, 2017; SARKAR *et al.*, 2021; SARKAR; ULLAH, 2020) e citomegalovírus (CHAUHAN; SINGH, 2020; HASAN *et al.*, 2020; KUMAR; SOOD; CHANDRA, 2020; PANDEY *et al.*, 2020), mostraram capacidade de induzir resposta imune antiviral *in silico* e alguns já em camundongos (WANG *et al.*, 2011). Dentre eles, podemos citar para o Herpes Vírus Humano associado ao Sarcoma de Kaposi (HHV-8), cujo tumor pode surgir em pessoas infectadas em fase de tratamento de outro câncer ou em HIV positivas (CHAUHAN *et al.*, 2019; DEGHANI; HASHEMPOUR; HASANSHAHI, 2019). Respostas semelhantes foram obtidas com multiepítipos de proteínas não estruturais, como de LMPs do HHV-4 (Vírus Epstein-Barr) (LI *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2015; OJHA; NANDANI; PRAJAPATI, 2019), patógeno capaz de elevar o risco de incidência de linfoma de Hodgkin.

Já o linfoma não Hodgkin pode ser causado por Vírus T-linfotrófico Humano (HTLV), da mesma família do HIV, e abordagens multiepítipos diferentes têm sido desenvolvidas para o seu combate (ABBASIFARID *et al.*, 2021; KABIRI *et al.*, 2018; PANDEY *et al.*, 2020; RAZA *et al.*, 2021). À imunodepressão pelo HIV favorece o surgimento de outros tumores no organismo humano e, logo, as vacinas multiepítipos contra esse agente também são importantes (AKBARI *et al.*, 2021; APOSTÓLICO *et*

al., 2017; KARDANI; HASHEMI; BOLHASSANI, 2020; SHABANI *et al.*, 2021). Apesar da existência de vacinação contra o vírus da hepatite B (HBV), ainda não existe contra o HCV, mas alguns multiepítipos vacinais contra este agente estão disponíveis e podem futuramente impactar na redução do câncer de fígado (DAWOOD *et al.*, 2019; IKRAM *et al.*, 2018; KHALID; ASHFAQ, 2020; YANG *et al.*, 2011).

Por fim, considerando os pacientes imunocomprometidos, que apresentam a maior gravidade das arboviroses (ex: dengue, zika, chikungunya) e dos recentes surtos virais (ex: síndromes respiratórias por coronavírus e Nipah), é importante a validação de constructos de multiepítipos contra essas doenças (BHARDWAJ; SHARMA; GROVER, 2021; DAR *et al.*, 2019; KHALID; ASHFAQ, 2020; NARULA *et al.*, 2018; PANDEY *et al.*, 2020; SHARMA *et al.*, 2021).

Apesar desses esforços, vários patógenos de ISTs com infecções multirresistentes e evasivas aos atuais tratamentos continuam sem alternativas para o seu combate (YAN; GAO, 2020). Sendo assim, aplicações de abordagens imunoinformáticas são fundamentais para a geração de novas alternativas de prevenção e tratamento, podendo levar à descoberta de novos medicamentos para o tratamento de infecções atuais e a auxiliar na contenção de grandes surtos futuros.

4. IMUNOINFORMÁTICA APLICADA A PARASITOS

Muitas parasitoses são um problema de saúde pública em países em desenvolvimento e são consideradas Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) pela OMS, a qual colocou como meta o controle e/ou erradicação destas até 2030 (WHO, 2021). A imunoinformática vai de encontro à essa demanda e vem sugerindo diversas vacinas contra as parasitoses mais comuns.

Até o momento, pode-se destacar a predição de vacinas multiepítipo usando a imunoinformática para algumas dessas doenças causadas por helmintos como a teníase e a cisticercose, ambas causadas pela *Taenia solium*, selecionando epítipos provenientes de proteínas de membrana para as predições (KAUR *et al.*, 2020), além das helmintíases transmitidas pelo solo, causadas pelos parasitas intestinais como o *Ascaris lumbricoides* e o *Trichuris trichiura* (KAUR *et al.*, 2021; ZAWAWI *et al.*, 2020).

Outro parasita de solo, o *Strongyloides stercoralis*, também possui vacinas multiepítipo preditas *in silico* (CULMA, 2021). Para a esquistossomose, uma infecção comum causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, foi predita uma vacina multiepítipo usando proteínas transmembrana da espécie *Schistosoma mansoni*, que é a espécie de maior ocorrência (SANCHES *et al.*, 2021). Uma outra abordagem usando a mesma metodologia foi desenvolver uma vacina usando o core proteoma de diferentes espécies de *Schistosoma* (*S. japonicum*, *S. mansoni* e *S. haematobium*) que também podem causar essa infecção (REHMAN *et al.*, 2021), além de uma vacina específica para a esquistossomose urogenital usando a espécie *S. haematobium* (ONILE; FADAHUNSI; *et al.*, 2020).

Outras vacinas desenvolvidas usando a imunoinformática baseada em epítomos para DTNs foram para a *Echinococcus granulosus*, causadora da equinococose cística (YU *et al.*, 2021); para o nematódeo *Brugia malayi*, causador da filariose, usando uma protease aspártica (BmAsp-1) (DAS *et al.*, 2021); e ainda para o parasita *Dracunculus medinensis*, conhecido como verme da Guiné e causador da dracunculíase (TALHA SARFRAZ; MEHMOOD RANA; AFFLIATIONS, 2021). Também para a oncocercose, causada pela *Onchocerca volvulus* foi sugerida uma vacina baseada em um inibidor de protease de cisteína (KWARTENG *et al.*, 2021).

5. VACINA MULTIEPÍTOPO CONTRA *Toxoplasma gondii*

Enquanto a maior parte do progresso feito em imunoinformática se restringe a procariotos, os patógenos eucarióticos são organismos com sistemas complicados, com ciclos de vida multifacetados, o que torna o estudo, tratamento e intervenção um desafio ainda maior (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013).

Dentre os conhecidos patógenos eucarióticos, os parasitas protozoários infecciosos para humanos representam uma ameaça significativa à saúde e causam mais de um milhão de mortes anualmente (LOZANO *et al.*, 2012). Juntas, as 5 principais doenças de protozoários ameaçam a vida de bilhões em todo o mundo, causam um ajuste na Esperança de Vida Corrigida pela Incapacidade (EVCI) em milhões de indivíduos, estão associados a morbidade significativa, e possuem amplas distribuições globais e grandes impactos econômicos (ANDREWS; FISHER; SKINNER-ADAMS, 2014; MURRAY *et al.*, 2012). Doenças como a malária, a

tripanossomíase, a toxoplasmose, a criptosporidiose e a leishmaniose afetam todo o mundo, com uma maior carga de doenças focada em regiões tropicais e subtropicais do mundo, e nas regiões temperadas da América do Norte e da região do Pacífico Asiático (TORGERSON; MASTROIACOVO, 2013).

Dentre estas, a toxoplasmose é causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*, que tem uma epidemiologia mundial e acredita-se que infecte 25-30% da população mundial (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Como uma zoonose, os humanos geralmente são infectados por transmissão horizontal através do consumo de cistos de tecido em carne contaminada ou de forma congênita, podendo acarretar morte fetal ou defeitos congênitos (COOK *et al.*, 2000; KAPPERUD *et al.*, 1996). Dada a importância dessa enfermidade e as limitações das opções atuais de tratamento para toxoplasmose, um estudo de pesquisadores da Nigéria aplicou uma técnica de imunoinformática para desenvolver uma vacina proteica multi-epítomos de subunidades contra *Toxoplasma gondii* (ONILE; OJO; *et al.*, 2020).

Este estudo aplicou abordagens *in silico* voltadas a proteínas micronemais (organelas típicas de protozoários) de *T. gondii* para a construção da vacina. A vacina projetada foi submetida a análises de antigenicidade, imunogenicidade, alergenicidade e parâmetros físico-químicos por simulação computacional, alcançando o design de uma vacina multi-epítomos de 657 aminoácidos com probabilidade de antigenicidade de 0,803. A estrutura vacinal foi classificada como estável, não alergênica e altamente imunogênica, apontando a nova candidata como uma alternativa para o futuro desenvolvimento de vacinas e enfrentamento desse patógeno protozoário (ONILE; FADAHUNSI; *et al.*, 2020).

6. CONCLUSÃO

O cenário atual da imunoinformática é muito promissor, com vacinas sendo desenvolvidas contra os mais diversos tipos de organismos, como foi acima exemplificado. As abordagens *in silico* permitem que diferentes espécies de bactérias que causam uma mesma doença sejam agrupadas a ponto de ser desenvolvida uma só vacina para sua prevenção, por exemplo (ZAHROH *et al.*, 2016).

As ISTs, que trazem diversas consequências (DE WAURE *et al.*, 2015), e mesmo assim são negligenciadas (WI *et al.*, 2017), ganharam reforço com a utilização de métodos computacionais para predição de epítomos, já que são métodos mais baratos e não dependem de uma infraestrutura laboratorial. Como por exemplo, a melhoria de vacinas contra o HPV (ABBASIFARID *et al.*, 2021; NAMVAR *et al.*, 2021; PANAHI *et al.*, 2020; SANAMI *et al.*, 2021).

A condição eucariótica dos parasitos foi, por muito tempo, um empecilho ao desenvolvimento de tratamentos e profilaxias contra esses organismos, entretanto, com a imunoinformática, isso se tornou mais fácil e acessível (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013). Na mesma linha das bactérias que causam uma mesma doença, parasitos que causam a esquistossomose também foram agrupados em uma só vacina (REHMAN *et al.*, 2021), o que pode levar ao seu uso global, sem necessidade de adaptação a depender da região.

Em suma, a imunoinformática permite que sejam criadas formas de intervenções em todo tipo de organismo, desde os mais simples, como vírus, até os mais complexos, como os eucariotos. Sua contribuição para a saúde pública em geral é muito grande e tem uma tendência de se tornar ainda maior com o desenvolvimento de novas ferramentas.

REFERÊNCIAS

ABBASIFARID, E.; BOLHASSANI, A.; IRANI, S.; SOTOODEHNEJADNEMATALAHI, F. In Silico and In Vitro Analysis of a Multiepitope L1-E7 Fusion Construct for Vaccine Development Against Human Papillomaviruses. **Letters in Drug Design & Discovery**, vol. 18, no. 11, p. 1061–1093, 4 Jun. 2021. <https://doi.org/10.2174/1570180818666210602160150>.

AKBARI, E.; KARDANI, K.; NAMVAR, A.; AJDARY, S.; ARDAKANI, E. M.; KHALAJ, V.; BOLHASSANI, A. In silico design and in vitro expression of novel multiepitope DNA constructs based on HIV-1 proteins and Hsp70 T-cell epitopes. **Biotechnology Letters**, vol. 43, no. 8, p. 1513–1550, 1 Aug. 2021. DOI 10.1007/S10529-021-03143-9/FIGURES/10. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10529-021-03143-9>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

ANDREWS, K. T.; FISHER, G.; SKINNER-ADAMS, T. S. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, vol. 4, no. 2, p. 95–111, 1 Aug. 2014. <https://doi.org/10.1016/J.IJPDDR.2014.02.002>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

APOSTÓLICO, J. de S.; SANTOS LUNARDELLI, V. A.; YAMAMOTO, M. M.; SANTOS SOUZA, H. F.; CUNHA-NETO, E.; BOSCARDIN, S. B.; ROSA, D. S. Dendritic cell targeting effectively boosts T cell responses elicited by an HIV multiepitope DNA vaccine. **Frontiers in**

Immunology, vol. 8, no. FEB, p. 101, 7 Feb. 2017. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.00101/BIBTEX>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

BHARDWAJ, A.; SHARMA, R.; GROVER, A. Immuno-informatics guided designing of a multi-epitope vaccine against dengue and Zika. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.2002720>, p. 1–15, 19 Nov. 2021. DOI 10.1080/07391102.2021.2002720. Accessed on: 23 nov. 2021.

CHAUHAN, V.; RUNGTA, T.; GOYAL, K.; SINGH, M. P. Designing a multi-epitope based vaccine to combat Kaposi Sarcoma utilizing immunoinformatics approach. **Scientific Reports** **2019** **9:1**, vol. 9, no. 1, p. 1–15, 21 Feb. 2019. DOI 10.1038/s41598-019-39299-8. Available at: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-39299-8>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

CHAUHAN, V.; SINGH, M. P. Immuno-informatics approach to design a multi-epitope vaccine to combat cytomegalovirus infection. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 147, p. 105279, 30 Apr. 2020. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2020.105279>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

COOK, A. J. C.; GILBERT, R. E.; BUFFOLANO, W.; ZUFFEREY, J.; PETERSEN, E.; JENUM, P. A.; FOULON, W.; SEMPRINI, A. E.; DUNN, D. T. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study Commentary: Congenital toxoplasmosis—further thought for food. **BMJ**, vol. 321, no. 7254, p. 142–147, 15 Jul. 2000. DOI 10.1136/BMJ.321.7254.142. Available at: <https://www.bmj.com/content/321/7254/142>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

CULMA, M. F. Strongyloides stercoralis proteome: A reverse approach to the identification of potential immunogenic candidates. **Microbial Pathogenesis**, vol. 152, p. 104545, 1 Mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2020.104545>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

DAR, H. A.; ZAHEER, T.; SHEHROZ, M.; ULLAH, N.; NAZ, K.; MUHAMMAD, S. A.; ZHANG, T.; ALI, A. Immunoinformatics-Aided Design and Evaluation of a Potential Multi-Epitope Vaccine against Klebsiella Pneumoniae. **Vaccines** **2019**, **Vol. 7**, **Page 88**, vol. 7, no. 3, p. 88, 12 Aug. 2019. DOI 10.3390/VACCINES7030088. Available at: <https://www.mdpi.com/2076-393X/7/3/88/htm>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

DAS, N. C.; PATRA, R.; GUPTA, P. S. sen; GHOSH, P.; BHATTACHARYA, M.; RANA, M. K.; MUKHERJEE, S. Designing of a novel multi-epitope peptide based vaccine against Brugia malayi: An in silico approach. **Infection, Genetics and Evolution**, vol. 87, p. 104633, 1 Jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2020.104633>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

DAWOOD, R. M.; MOUSTAFA, R. I.; ABDELHAFEZ, T. H.; EL-SHENAWY, R.; EL-ABD, Y.; BADER EL DIN, N. G.; DUBUISSON, J.; EL AWADY, M. K. A multiepitope peptide vaccine against HCV stimulates neutralizing humoral and persistent cellular responses in mice. **BMC Infectious Diseases**, vol. 19, no. 1, p. 1–11, 5 Nov. 2019. DOI 10.1186/S12879-019-4571-5/FIGURES/4. Available at: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-019-4571-5>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

DE WAURE, C.; MANNOCCI, A.; CADEDDU, C.; GUALANO, M. R.; CHIARADIA, G.; VINCITORIO, D.; DI STANISLAO, F.; DE VITO, E.; LANGIANO, E.; BOCCIA, A.; ICCIARDI, W.; LA TORRE, G. Knowledge, attitudes and behaviour about sexually transmitted infections: A survey among Italian university female students. **Epidemiology Biostatistics and Public Health**, vol. 12, no. 2, p. e111112, 2015. DOI 10.2427/11112. Available at: <https://moh-it.pure.elsevier.com/en/publications/knowledge-attitudes-and-behaviour-about-sexually-transmitted-infe>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

DEHBAREZ, F. M.; NEZAFAT, N.; MAHMOODI, S. In Silico Design of a Novel Multi-Epitope Peptide Vaccine Against Hepatocellular Carcinoma. **Letters in Drug Design & Discovery**, vol. 17, no. 9, p. 1164–1176, 1 May 2020. <https://doi.org/10.2174/1570180817999200502030038>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

DEHGHANI, B.; HASHEMPOUR, T.; HASANSHAHI, Z. Using Immunoinformatics and Structural Approaches to Design a Novel HHV8 Vaccine. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics** 2019 **26:1**, vol. 26, no. 1, p. 321–331, 19 Apr. 2019. DOI 10.1007/S10989-019-09839-X. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10989-019-09839-x>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A guide to in silico vaccine discovery for eukaryotic pathogens. **Briefings in Bioinformatics**, vol. 14, no. 6, p. 753–774, 1 Nov. 2013. DOI 10.1093/BIB/BBS066. Available at: <https://academic.oup.com/bib/article/14/6/753/190713>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

HASAN, M.; ISLAM, S.; CHAKRABORTY, S.; MUSTAFA, A. H.; AZIM, K. F.; JOY, Z. F.; HOSSAIN, M. N.; FOYSAL, S. H.; HASAN, M. N. Contriving a chimeric polyvalent vaccine to prevent infections caused by herpes simplex virus (type-1 and type-2): an exploratory immunoinformatic approach. **Journal of biomolecular structure & dynamics**, vol. 38, no. 10, p. 2898–2915, 2 Jul. 2020. DOI 10.1080/07391102.2019.1647286. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31328668/>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

HERRERA, L. R. M. Reverse Vaccinology Approach in Constructing a Multi-Epitope Vaccine Against Cancer-Testis Antigens Expressed in Non-Small Cell Lung Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, vol. 22, no. 5, p. 1495–1506, 1 May 2021. DOI 10.31557/APJCP.2021.22.5.1495. Available at: http://journal.waocp.org/article_89599.html. Accessed on: 23 Nov. 2021.

IKRAM, A.; ZAHEER, T.; AWAN, F. M.; OBAID, A.; NAZ, A.; HANIF, R.; PARACHA, R. Z.; ALI, A.; NAVEED, A. K.; JANJUA, H. A. Exploring NS3/4A, NS5A and NS5B proteins to design conserved subunit multi-epitope vaccine against HCV utilizing immunoinformatics approaches. **Scientific Reports** 2018 **8:1**, vol. 8, no. 1, p. 1–14, 31 Oct. 2018. DOI 10.1038/s41598-018-34254-5. Available at: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-34254-5>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

KABIRI, M.; SANKIAN, M.; SADRI, K.; TAFAGHODI, M. Robust mucosal and systemic responses against HTLV-1 by delivery of multi-epitope vaccine in PLGA nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, vol. 133, p. 321–330, 1 Dec. 2018. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2018.11.003>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

KAPPERUD, G.; JENUM, P. A.; STRAY-PEDERSEN, B.; MELBY, K. K.; ESKILD, A.; ENG, J. Risk Factors for Toxoplasma gondii Infection in Pregnancy Results of a Prospective Case-Control Study in Norway. **American Journal of Epidemiology**, vol. 144, no. 4, p. 405–412, 15 Aug. 1996. DOI 10.1093/OXFORDJOURNALS.AJE.A008942. Available at: <https://academic.oup.com/aje/article/144/4/405/161669>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

KARDANI, K.; HASHEMI, A.; BOLHASSANI, A. Comparative analysis of two HIV-1 multi-epitope polypeptides for stimulation of immune responses in BALB/c mice. **Molecular Immunology**, vol. 119, p. 106–122, 1 Mar. 2020. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2020.01.013>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

KAUR, R.; ARORA, N.; JAMAKHANI, M. A.; MALIK, S.; KUMAR, P.; ANJUM, F.; TRIPATHI, S.; MISHRA, A.; PRASAD, A. Development of multi-epitope chimeric vaccine against Taenia solium by exploring its proteome: an in silico approach.

<https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1711057>, vol. 19, no. 1, p. 105–114, 2 Jan. 2020. DOI 10.1080/14760584.2019.1711057. Accessed on: 23 Nov. 2021.

KAUR, R.; ARORA, N.; RAWAT, S. S.; KESHRI, A. K.; SINGH, N.; SHOW, S. K.; KUMAR, P.; MISHRA, A.; PRASAD, A. Immunoinformatics driven construction of multi-epitope vaccine candidate against *Ascaris lumbricoides* using its entire immunogenic epitopes. **Expert Review of Vaccines**, p. 1–13, 3 Sep. 2021. DOI 10.1080/14760584.2021.1974298. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14760584.2021.1974298>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

KHALID, H.; ASHFAQ, U. A. Exploring HCV genome to construct multi-epitope based subunit vaccine to battle HCV infection: Immunoinformatics based approach. **Journal of Biomedical Informatics**, vol. 108, p. 103498, 1 Aug. 2020. <https://doi.org/10.1016/J.JBI.2020.103498>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

KUMAR, N.; SOOD, D.; CHANDRA, R. Vaccine Formulation and Optimization for Human Herpes Virus-5 through an Immunoinformatics Framework. **ACS Pharmacology and Translational Science**, vol. 3, no. 6, p. 1318–1329, 11 Dec. 2020. DOI 10.1021/ACSPTSCI.0C00139/SUPPL_FILE/PT0C00139_SI_001.PDF. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsptsci.0c00139>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

KWARTENG, A.; ASIEDU, E.; MUBARIK, Y.; KATAWA, G.; ASIEDU, S. O. Exploring Onchocerca volvulus Cysteine Protease Inhibitor for Multi-epitope Subunit Vaccine Against Onchocerciasis: An Immunoinformatics Approach. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics 2021 27:3**, vol. 27, no. 3, p. 1953–1966, 8 May 2021. DOI 10.1007/S10989-021-10224-W. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10989-021-10224-w>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

LI, W.; CHEN, Q.; LIN, Q.; LV, Y.; FENG, J.; LIU, J.; XU, W.; CHEN, S.; ZHU, X.; ZHANG, L. Immunogenicity of a multiepitope plasmid DNA encoding T and B lymphocyte epitopes from latent membrane protein 2 (LMP2) of Epstein-Barr virus as a vaccine in mice. **Protein and peptide letters**, vol. 20, no. 10, p. 1136–1143, 13 Aug. 2013. DOI 10.2174/09298665113209990005. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23688153/>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

LIN, X.; CHEN, S.; XUE, X.; LU, L.; ZHU, S.; LI, W.; CHEN, X.; ZHONG, X.; JIANG, P.; SENNAME, T. S.; ZHENG, Y.; ZHANG, L. Chimerically fused antigen rich of overlapped epitopes from latent membrane protein 2 (LMP2) of Epstein-Barr virus as a potential vaccine and diagnostic agent. **Cellular & Molecular Immunology 2016 13:4**, vol. 13, no. 4, p. 492–501, 13 Apr. 2015. DOI 10.1038/cmi.2015.29. Available at: <https://www.nature.com/articles/cmi201529>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

LOZANO, R.; NAGHAVI, M.; FOREMAN, K.; LIM, S.; SHIBUYA, K.; ABOYANS, V.; ABRAHAM, J.; ADAIR, T.; AGGARWAL, R.; AHN, S. Y.; ALMAZROA, M. A.; ALVARADO, M.; ANDERSON, H. R.; ANDERSON, L. M.; ANDREWS, K. G.; ATKINSON, C.; BADDOUR, L. M.; BARKER-COLLO, S.; BARTELS, D. H.; ... MURRAY, C. J. L. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, vol. 380, no. 9859, p. 2095–2128, 15 Dec. 2012. DOI 10.1016/S0140-6736(12)61728-0. Available at: <http://www.thelancet.com/article/S0140673612617280/fulltext>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, vol. 363, no. 9425, p. 1965–1976, 12 Jun. 2004. DOI 10.1016/S0140-6736(04)16412-X. Available at: <http://www.thelancet.com/article/S014067360416412X/fulltext>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

MURRAY, C. J. L.; VOS, T.; LOZANO, R.; NAGHAVI, M.; FLAXMAN, A. D.; MICHAUD, C.; EZZATI, M.; SHIBUYA, K.; SALOMON, J. A.; ABDALLA, S.; ABOYANS, V.; ABRAHAM, J.; ACKERMAN, I.; AGGARWAL, R.; AHN, S. Y.; ALI, M. K.; ALMAZROA, M. A.; ALVARADO, M.; ANDERSON, H. R.; ... LOPEZ, A. D. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, vol. 380, no. 9859, p. 2197–2223, 15 Dec. 2012. DOI 10.1016/S0140-6736(12)61689-4.. Accessed on: 23 Nov. 2021.

NAMVAR, A.; BOLHASSANI, A.; JAVADI, G.; NOORMOHAMMADI, Z. Combination of human papillomaviruses L1 and L2 multiepitope constructs protects mice against tumor cells. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, vol. 35, no. 6, p. 1055–1068, 1 Dec. 2021. DOI 10.1111/FCP.12690. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/fcp.12690>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

NARULA, A.; PANDEY, R. K.; KHATOON, N.; MISHRA, A.; PRAJAPATI, V. K. Excavating chikungunya genome to design B and T cell multi-epitope subunit vaccine using comprehensive immunoinformatics approach to control chikungunya infection. **Infection, Genetics and Evolution**, vol. 61, p. 4–15, 1 Jul. 2018. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2018.03.007>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

OJHA, R.; NANDANI, R.; PRAJAPATI, V. K. Contriving multiepitope subunit vaccine by exploiting structural and nonstructural viral proteins to prevent Epstein–Barr virus-associated malignancy. **Journal of Cellular Physiology**, vol. 234, no. 5, p. 6437–6448, 1 May 2019. DOI 10.1002/JCP.27380. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.27380>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

ONILE, O. S.; FADAHUNSI, A. I.; ADEKUNLE, A. A.; OYEYEMI, B. F.; ANUMUDU, C. I. An immunoinformatics approach for the design of a multi-epitope subunit vaccine for urogenital schistosomiasis. **PeerJ**, vol. 8, p. e8795, 2 Oct. 2020. DOI 10.7717/PEERJ.8795/FIG-7. Available at: <https://peerj.com/articles/8795>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

ONILE, O. S.; OJO, G. J.; OYEYEMI, B. F.; AGBOWURO, G. O.; FADAHUNSI, A. I. Development of multiepitope subunit protein vaccines against *Toxoplasma gondii* using an immunoinformatics approach. **NAR Genomics and Bioinformatics**, vol. 2, no. 3, 1 Sep. 2020. DOI 10.1093/NARGAB/LQAA048.. Accessed on: 23 Nov. 2021.

PANAHI, H. A.; BOLHASSANI, A.; JAVADI, G.; NOORMOHAMMADI, Z.; AGI, E. Development of multiepitope therapeutic vaccines against the most prevalent high-risk human papillomaviruses. <https://doi.org/10.2217/imt-2019-0196>, vol. 12, no. 7, p. 459–479, 22 Apr. 2020. DOI 10.2217/IMT-2019-0196. Accessed on: 23 Nov. 2021.

PANDEY, R. K.; OJHA, R.; DIPTI, K.; KUMAR, R.; PRAJAPATI, V. K. Immunoselective algorithm to devise multi-epitope subunit vaccine fighting against human cytomegalovirus infection. **Infection, Genetics and Evolution**, vol. 82, p. 104282, 1 Aug. 2020. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2020.104282>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

RAGONE, C.; MANOLIO, C.; CAVALLUZZO, B.; MAURIELLO, A.; TORNESELLO, M. L.; BUONAGURO, F. M.; CASTIGLIONE, F.; VITAGLIANO, L.; IACCARINO, E.; RUVO, M.; TAGLIAMONTE, M.; BUONAGURO, L. Identification and validation of viral antigens sharing sequence and structural homology with tumor-associated antigens (TAAs). **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, vol. 9, no. 5, p. e002694, 1 May 2021. DOI 10.1136/JITC-2021-002694. Available at: <https://jitc.bmj.com/content/9/5/e002694>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

RAPPUOLI, R.; GREGORIO, E. de; GIUDICE, G. del; PHOGAT, S.; PECETTA, S.; PIZZA, M.; HANON, E. Vaccinology in the post–COVID-19 era. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences, vol. 118, no. 3, 19 Jan. 2021. DOI 10.1073/PNAS.2020368118. Available at: <https://www.pnas.org/content/118/3/e2020368118>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

RAZA, M. T.; MIZAN, S.; YASMIN, F.; AKASH, A. S.; SHAHIK, S. M. Epitope-based universal vaccine for Human T-lymphotropic virus-1 (HTLV-1). **PLOS ONE**, vol. 16, no. 4, p. e0248001, 1 Apr. 2021. DOI 10.1371/JOURNAL.PONE.0248001. Available at: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0248001>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

REHMAN, A.; AHMAD, S.; SHAHID, F.; ALBUTTI, A.; ALWASHMI, A. S. S.; ALJASIR, M. A.; ALHUMEED, N.; QASIM, M.; ASHFAQ, U. A.; TAHIR UL QAMAR, M. Integrated Core Proteomics, Subtractive Proteomics, and Immunoinformatics Investigation to Unveil a Potential Multi-Epitope Vaccine against Schistosomiasis. **Vaccines** **2021**, Vol. **9**, Page **658**, vol. 9, no. 6, p. 658, 16 Jun. 2021. DOI 10.3390/VACCINES9060658.

RISINGER, C.; SØRENSEN, K. K.; JENSEN, K. J.; OLOFSSON, S.; BERGSTRÖM, T.; BLIXT, O. Linear Multiepitope (Glyco)peptides for Type-Specific Serology of Herpes Simplex Virus (HSV) Infections. **ACS Infectious Diseases**, vol. 3, no. 5, p. 360–367, 12 May 2017. DOI 10.1021/ACSINFECDIS.7B00001/SUPPL_FILE/ID7B00001_SI_001.PDF. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsinfecdis.7b00001>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

SANAMI, S.; AZADEGAN-DEHKORDI, F.; RAFIEIAN-KOPAEI, M.; SALEHI, M.; GHASEMI-DEHNOO, M.; MAHOOTI, M.; ALIZADEH, M.; BAGHERI, N. Design of a multi-epitope vaccine against cervical cancer using immunoinformatics approaches. **Scientific Reports** **2021** **11:1**, vol. 11, no. 1, p. 1–15, 11 Jun. 2021. DOI 10.1038/s41598-021-91997-4. Available at: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-91997-4>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

SANCHES, R. C. O.; TIWARI, S.; FERREIRA, L. C. G.; OLIVEIRA, F. M.; LOPES, M. D.; PASSOS, M. J. F.; MAIA, E. H. B.; TARANTO, A. G.; KATO, R.; AZEVEDO, V. A. C.; LOPES, D. O. Immunoinformatics Design of Multi-Epitope Peptide-Based Vaccine Against *Schistosoma mansoni* Using Transmembrane Proteins as a Target. **Frontiers in Immunology**, vol. 12, p. 490, 2 Mar. 2021. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.621706/BIBTEX>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

SARKAR, B.; ULLAH, Md. A. Designing Novel Subunit Vaccines against Herpes Simplex Virus-1 using Reverse Vaccinology Approach. **bioRxiv**, , p. 2020.01.10.901678, 11 Jan. 2020. DOI 10.1101/2020.01.10.901678.

SARKAR, B.; ULLAH, Md. A.; ARAF, Y.; DAS, S.; RAHMAN, Md. H.; MOIN, A. T. Designing novel epitope-based polyvalent vaccines against herpes simplex virus-1 and 2 exploiting the immunoinformatics approach. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, vol. 39, no. 17, p. 6585–6605, 22 Nov. 2021. DOI 10.1080/07391102.2020.1803969. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07391102.2020.1803969>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

SETIAWAN, T.; RIZARULLAH, R. Predicting Multi-Epitope Peptide Cancer Vaccine from Novel TAA Topo48. **Journal of Science and Applicative Technology**, vol. 5, no. 1, p. 171–178, 7 May 2021. DOI 10.35472/JSAT.V5I1.349.

SHABANI, S. H.; KARDANI, K.; MILANI, A.; BOLHASSANI, A. In Silico and in Vivo Analysis of HIV-1 Rev Regulatory Protein for Evaluation of a Multiepitope-based Vaccine Candidate. 2021. DOI 10.1080/08820139.2020.1867163.

SHARMA, S.; KUMARI, V.; KUMBHAR, B. V.; MUKHERJEE, A.; PANDEY, R.; KONDABAGIL, K. Immunoinformatics approach for a novel multi-epitope subunit vaccine

design against various subtypes of Influenza A virus. **Immunobiology**, vol. 226, no. 2, p. 152053, 1 Mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.IMBIO.2021.152053>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

TALHA SARFRAZ, M.; MEHMOOD RANA, M.; AFFLIATIONS, A. Designing a Multi-Epitope Vaccine against *Dracunculus medinensis* by Employing Immuno-Informatics and In Silico Approaches. 18 May 2021. DOI 10.20944/PREPRINTS202105.0400.V1. Available at: <https://www.preprints.org/manuscript/202105.0400/v1>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

TORGERSON, P. R.; MASTROIACOVO, P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. **Bull World Health Organ**, 2013. <https://doi.org/10.2471/BLT.12.111732>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

WANG, X.; XIE, G.; LIAO, J.; YIN, D.; GUAN, W.; PAN, M.; LI, J.; LI, Y. Design and evaluation of a multi-epitope assembly Peptide (MEAP) against herpes simplex virus type 2 infection in BALB/c mice. **Virology Journal**, vol. 8, no. 1, p. 1–10, 16 May 2011. DOI 10.1186/1743-422X-8-232/COMMENTS.

WHO. **Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals A framework for monitoring**. [S. l.: s. n.], 2021. Available at: <http://apps.who.int/bookorders>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

WI, T.; LAHRA, M. M.; NDOWA, F.; BALA, M.; DILLON, J. A. R.; RAMON-PARDO, P.; EREMIN, S. R.; BOLAN, G.; UNEMO, M. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Global surveillance and a call for international collaborative action. **PLOS Medicine**, vol. 14, no. 7, p. e1002344, 1 Jul. 2017. DOI 10.1371/JOURNAL.PMED.1002344.

YANG, G.; CHEN, S.; ZHU, X.; LIANG, S.; LIU, L.; REN, D. A Synthetic Multi-epitope Antigen Enhances Hepatitis C Virus-Specific B- and T-Cell Responses. <https://home.liebertpub.com/vim>, vol. 24, no. 2, p. 109–118, 30 Mar. 2011. DOI 10.1089/VIM.2010.0096.

YU, M.; ZHU, Y.; LI, Y.; CHEN, Z.; SHA, T.; LI, Z.; ZHANG, F.; DING, J. Design of a Novel Multi-Epitope Vaccine Against *Echinococcus granulosus* in Immunoinformatics. **Frontiers in Immunology**, vol. 12, p. 3065, 12 Aug. 2021. DOI <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.668492/BIBTEX>. Accessed on: 23 Nov. 2021.

ZAHROH, H.; MA'RUP, A.; TAMBUNAN, U. S. F.; PARIKESIT, A. A. Immunoinformatics Approach in Designing Epitope-based Vaccine against Meningitis-inducing Bacteria (*Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, and *Haemophilus influenzae* Type b). **Drug Target Insights**, vol. 10, no. 1, p. 10, 1 Nov. 2016. DOI 10.33393/DTI.2016.1421. Available at: <https://journals.aboutscience.eu/index.php/dti/article/view/1421>. Accessed on: 17 Nov. 2021.

ZAWAWI, A.; FORMAN, R.; SMITH, H.; MAIR, I.; JIBRIL, M.; ALBAQSHI, M. H.; BRASS, A.; DERRICK, J. P.; ELSE, K. J. In silico design of a T-cell epitope vaccine candidate for parasitic helminth infection. **PLOS Pathogens**, vol. 16, no. 3, p. e1008243, 2020. DOI 10.1371/JOURNAL.PPAT.1008243.

CAPÍTULO 08

Vacínologia Reversa Aplicada A Bactérias Patogênicas De Interesse Humano E Veterinário

Andrei Giacchetto Felice¹; Arun Kumar Jaiswal²; Felipe Lucas Zen³;
Ligia Carolina da Silva Prado²; Michele Min San Wu³; Pedro Henrique Marques³;
Rafael Destro Rosa Tiveron¹; Rafael Obata Trevisan⁴;
Wylerson Guimarães Nogueira⁵; Yngrid Victória Cassiano Mascarenhas³;
Carlo José Freire Oliveira⁶; Vasco Ariston de Carvalho Azevedo⁷;
Siomar de Castro Soares⁶

¹ Mestrando em Ciências, ênfase em Parasitologia e Imunologia Aplicadas. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia – UFTM

² Pós – Doutorando em Bioinformática. Programa Interunidades de Pós – Graduação em Bioinformática – UFMG

³ Graduando do curso de Biomedicina. Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM

⁴ Doutorando em Ciências, ênfase em Parasitologia e Imunologia Aplicadas. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia – UFTM

⁵ Doutorando em Bioinformática. Programa Interunidades de Pós – Graduação em Bioinformática – UFMG

⁶ Professor Adjunto do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM

⁷ Professor Titular do Departamento de Genética, Ecologia e Evolução - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

RESUMO

A Vacínologia Reversa tem se mostrado cada vez mais surpreendente na descoberta de novas formas de tratamento contra diversas doenças, seja para humanos ou para animais. Após o seu surgimento, todo o processo de produção e disponibilização de imunização ao redor do mundo se tornou mais rápido e mais barato, já que milhões de dados podem ser estudados e analisados ao mesmo tempo. Quando esta ferramenta começa a ser aplicada para estudos bacterianos, os níveis epidemiológicos de diversas doenças têm caído consideravelmente quando comparado ao período anterior do surgimento dela. Neste capítulo, iremos abordar diversos trabalhos de vacínologia reversa em organismos patogênicos de interesse médico e veterinário, tais como *Treponema pallidum*, *Mycobacterium leprae* e *lepromatosis*, o gênero *Rickettsia*, *Bordetella pertussis*, *Serratia marcescens*, *Mycoplasma genitalium*, *Haemophilus ducreyi*, *Moraxella catarrhalis*, *Acinetobacter baumannii*, e espécies de *Brucella*, *Campylobacter* e *Vibrio*.

Palavras-chave: Vacínologia Reversa. Bactérias. Humanos. Animais.

1. VACINOLOGIA REVERSA DE DIVERSAS BACTÉRIAS DE INTERESSE MÉDICO E VETERINÁRIO

Utilizado pela primeira vez na transição ao Século XXI, o termo “Vacínologia Reversa” surge como uma maneira para explicar o método adotado para o desenvolvimento de diversas vacinas que faziam a identificação e depois selecionavam os antígenos com grande capacidade de elicitar a proteção imunológica contra agentes causadores de doenças infecciosas (RAPPUOLI, 2000). Com o passar dos anos, essa metodologia se desenvolveu e começou a ser utilizada em grande escala, visto que poderia acelerar o processo de desenvolvimento de uma vacina em mais de cinco vezes, quando comparado ao desenvolvimento convencional. Durante esse capítulo, vamos falar de trabalhos que utilizam essa metodologia de vacínologia reversa com bactérias de grande interesse médico e veterinário, já que são organismos que podem estar envolvidos em surtos epidêmicos, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS).

1.1. *Treponema pallidum*

A bactéria *Treponema pallidum* é responsável pela doença sexualmente transmissível chamada sífilis. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 12 milhões de pessoas contraem a infecção e desenvolvem a sífilis a cada ano (JAISWAL e colab., 2020). Esta bactéria Gram-negativa causa infecções em múltiplos estágios como a sífilis primária humana, sífilis secundária e sífilis terciária pelas relações sexuais desprotegidas entre parceiros por meio de lesões ativas. A prevalência global da sífilis destaca a necessidade de novas estratégias e abordagens para lidar com essa doença (JAISWAL e colab., 2017, 2020). Em 2017, (JAISWAL e colab., 2017) publicaram um artigo baseado na abordagem da vacínologia reversa para identificar alvos vacinais de *Treponema pallidum*. Em seu trabalho, utilizaram 13 cepas genômicas da espécie e realizaram análises *in silico*. Eles compararam todos os 13 genomas e identificaram 565 proteínas não homólogas ao hospedeiro, que estavam conservadas. Também foram realizadas análises de localização subcelular e propriedades antigênicas com probabilidades de adesão, e identificaram 15 candidatos a vacinas para *Treponema pallidum*

1.2. Mycobacterium leprae e Mycobacterium lepromatosis

A hanseníase é uma doença transmissível causada por *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium lepromatosis* (DEPS e COLLIN, 2021). A hanseníase é uma doença contagiosa e ainda endêmica em várias partes do mundo, no entanto, países como Brasil, Índia e Indonésia são responsáveis por quase 80% dos novos casos registrados em todo o mundo. De acordo com dados globais, 95% dos casos de hanseníase foram documentados em apenas 23 países, o que demonstra a transmissão constante da infecção (HAMBRIDGE e colab., 2021). A infecção afeta principalmente a pele e os nervos periféricos das pessoas infectadas. Apesar da lepra ser tratável, a resistência aos antibióticos se tornou uma grande preocupação e revela o risco da doença em pacientes sob prevenção secundária (quimioterapia).

A terapia multidroga foi uma parte vital da redução dos casos de hanseníase de 1981 até 2005, quando a resistência à rifampicina foi relatada contra a hanseníase, que foi a terapia multidroga mais eficaz contra a lepra (JAISWAL e colab., 2021). Após a resistência à rifampicina, outros antibióticos fluoroquinolonas foram usados para tratar a hanseníase, mas a resistência improvável das cepas de *Mycobacterium leprae* às quinolonas foi relatada em várias partes do mundo (CHOKKAKULA e colab., 2019). Em 2021, (JAISWAL e colab., 2021) utilizaram a vacínologia reversa e abordaram a genômica subtrativa para a identificação de uma vacina candidata e alvos de drogas para a lepra. Em seu trabalho foram utilizadas 6 cepas genômicas e identificaram 411 proteínas não homólogas aos hospedeiros, que estavam conservadas. Após a análise da localização subcelular, 141 proteínas pertenciam à categoria de membrana, secretada e exposta a superfície, e então suas propriedades antigênicas também foram avaliadas e como resultado, identificaram 12 alvos vacinais para *Mycobacterium leprae* TN e comumente presentes em *Mycobacterium lepromatosis*, que possivelmente são candidatos vacinais para a lepra.

1.3. Gênero Rickettsia

O gênero *Rickettsia* foi descrito pela primeira vez em 1916 e foram inicialmente agrupadas à família *Rickettsiaceae* diversas bactérias que somente tinham em comum o estilo de vida intracelular (DA ROCHA-LIMA, 1916; WEISS, MOULDER E

ORDER, 1939). O gênero *Rickettsia* possui microrganismos Gram-negativos intracelulares obrigatórios e que podem ser endossimbiontes com outros organismos ou patogênicos (AZAD e RADULOVIC, 2003). Esse gênero é subdividido em quatro clados, sendo estes o grupo tifo (TG), o grupo das febres maculosas (SFG), o grupo ancestral, e mais recentemente, o grupo de transição (DIOP e colab., 2020; GILLESPIE, Joseph J. e colab., 2007).

Existem vários estudos publicados sobre pesquisa de vacinas para espécies que compõem o gênero, e alguns mais específicos para espécies de alguns dos grupos principais (CARO-GOMEZ e colab., 2014; LEW-TABOR e RODRIGUEZ VALLE, 2016; PALMER, Guy H. e colab., 2012). Recentemente, um grupo de pesquisadores trabalharam de uma forma mais abrangente, que abrigasse todos as espécies que compunham esse gênero. Eles utilizaram 47 genomas completos disponíveis em um banco de dados online, e baseado em uma abordagem da Vacinologia reversa, puderam encontrar 12 proteínas com potenciais antigênicos para serem utilizadas como alvos de drogas, e outras 8 proteínas para serem utilizadas para alvos de vacinas (FELICE e ALVES e colab., 2021).

1.4. *Bordetella pertussis*

A espécie *Bordetella pertussis* é uma das principais representantes do gênero *Bordetella*, junto com *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica*. Ela é a causadora de uma doença respiratória altamente contagiosa transmitida por gotículas em aerossol, conhecida como coqueluche. É um microrganismo Gram-negativo, e que foi descrito pela primeira vez em 1906 por Bordet e Gengou (MELVIN e colab., 2014). Na década de 1940 foi desenvolvida a primeira vacina contra a coqueluche, baseada na célula inteira do microrganismo, porém foi causadora de reações adversas como convulsão (CODY e colab., 1981; DECKER e colab., 1995). Anos depois, já na década de 70, foi desenvolvida uma segunda vacina, essa porém mais moderna, baseada na combinação de diferentes fatores de virulência, como a hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina (PRN) e nas fímbrias 2 e 3 (FIM2 / 3) e ligadas com adjuvantes como alumínio, e que hoje faz parte da Tríplice Viral (BARKOFF e colab., 2019).

A coqueluche ficou controlada por muitos anos, porém a circulação do microrganismo continua sendo muito grande, afetando muitas áreas onde a cobertura

vacinal é baixa, ou devido ao surgimento de cepas resistentes ou ainda, pela diminuição da imunidade (TINDBERG e colab., 1999; WIRSING VON KÖNIG e colab., 2002).

Com base nesse grande número de casos que ainda acomete grande parte da população, estudos buscaram maneiras de encontrar quais os motivos desse aumento, incluindo achados de genes que podem estar relacionados com ele (BART e colab., 2010). Então, um grupo de pesquisadores recentemente, baseado em análises de Bioinformática, mais especificamente usando a vacinologia reversa, conseguiu encontrar algumas proteínas que tinham grande potencial imunogênico e que poderiam ser utilizadas para novos testes de eficácia como potenciais alvos de vacinas. Esse grupo encontrou 7 proteínas que tinham uma boa probabilidade de adesão à moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) I e II e que faziam parte de processos essenciais para a sobrevivência do microrganismo dentro do hospedeiro, de modo que, qualquer alteração nas funções dessas proteínas poderia resultar em pontos positivos na luta contra a coqueluche (FELICE e SANTOS e colab., 2021).

1.5. Serratia marcescens

Anteriormente definido como não patogênico, o bacilo Gram-negativo *Serratia marcescens*, atualmente é considerado um patógeno nosocomial oportunista, ocorrendo principalmente em episódios de surtos hospitalares em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (FERREIRA e colab., 2020; SARALEGUI e colab., 2020). Pode causar infecções do trato urinário, oculares, de corrente sanguínea, no sistema nervoso central, de feridas, pneumonia e endocardite (MAHLEN, 2011; WU e colab., 2013). Normalmente, as cepas de *S. marcescens* envolvidas em eventos epidêmicos são multirresistentes (M.L. e colab., 2019) o que levou a OMS a incluir essa bactéria entre uma lista prioritária de bactérias que necessitam de mais pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos (E e colab., 2017).

Tratando-se da *S. marcescens*, há pouca informação sobre vacinologia associada à bactéria. O primeiro estudo relacionado foi feito por Kreger e colaboradores (1986), que realizaram ensaios de imunização com preparações purificadas de uma protease (atualmente conhecida como serralisina) de *S. marcescens* em coelhos e notaram uma significativa redução nos danos à infecção induzida de córnea (ceratite bacteriana)

(KREGGER e colab., 1986; SHANKS e colab., 2015). E em 1992, foi observado uma maior resistência à infecção de *S. marcescens* em camundongos após a vacinação com a mesma bactéria inativada por formalina (KUMAGAI e colab., 1992).

Mais recentemente, aplicando metodologias de vacinologia reversa e abordagens de genômica subtrativa *in silico*, 7 proteínas foram consideradas potenciais alvos para vacinas (PRADO e colab., 2021). Foram preditas duas enzimas relacionadas à clivagem da mureína, um peptidoglicano essencial que compõe a parede celular Gram-negativa e forma um sáculo que envolve completamente a célula bacteriana, mantendo a forma e o tamanho da célula, fornecendo suporte mecânico e protegendo a bactéria da lise osmótica. (DOMÍNGUEZ-GIL e colab., 2016; KORAIMANN, 2003). Outra proteína predita como candidata a vacina é lipoproteína associada ao divisossomo (YraP), a qual é homóloga à proteína GNA2091 a qual faz parte da vacina licenciada *Neisseria meningitidis* 4CMenB, também desenvolvida a partir de vacinologia reversa (BOS e colab., 2014; SERRUTO e colab., 2012). Também foram preditos um receptor dependente de vitamina B12 (TonB) e uma porina ferricromo (FhuA), ambas moléculas conhecidas por serem importantes na virulência de bactérias (REEVES e colab., 2000; STORK e colab., 2010), e um transportador UgpB, importante para a biossíntese da membrana plasmática da bactéria (ADHIKARI e colab., 2017).

1.6. Mycoplasma genitalium

Mycoplasma genitalium surgiu nas últimas décadas como um causador de infecções sexualmente transmissíveis. A bactéria se trata de um organismo fastidioso, intracelular obrigatório, de crescimento lento, considerado o menor procarioto com capacidade de reprodução independente (TAYLOR-ROBINSON e JENSEN, 2011). Foi isolado pela primeira vez em 1981, proveniente do exsudato uretral de dois homens com quadro de uretrite não gonocócica (TULLY e colab., 1981), mas não foi alvo de maiores estudos devido à dificuldade na cultura do organismo na época, com nova detecção ocorrendo somente após o desenvolvimento do PCR (JENSEN e colab., 1991; PALMER, H, 1991). Este organismo é responsável por causar uma inflamação no trato urogenital através de uma adesão às células epiteliais, incitando o envio de sinais inflamatórios (MCGOWIN e TOTTEN, 2017).

Coinfecções com outros tipos de ISTs, como por exemplo HIV, *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* foram relatados em diversos trabalhos (FERNÁNDEZ-HUERTA e ESPASA, 2019; HARRISON e colab., 2019; MAHLANGU e colab., 2019; NAPIERALA MAVEDZENGE e colab., 2015), e pela sua importância clínica, foi elaborado uma diretriz para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de *M. genitalium* que foi incluído pelo Centro de Controle de Doenças (CDC) às suas Diretrizes de Tratamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis, em 2015 (WORKOWSKI e BOLAN, 2015). Apesar disso, o tratamento para infecções desse organismo ainda é um desafio, pelo fato de o patógeno não apresentar parede celular, não sendo viável a utilização de certos antibióticos como beta-lactâmicos (penicilina e cefalosporinas), que possuem como alvo a biossíntese da parede (J.S. e C., 2015). Outros antibióticos comumente utilizados se provam eficazes no tratamento dessa infecção, incluindo macrolídeos, tetraciclina e quinolonas, entretanto tem se observado uma alta de resistência a antibióticos (BRADSHAW e colab., 2017; TAYLOR-ROBINSON, 2014).

Em um estudo, *in silico*, realizado por Nogueira et al (NOGUEIRA e colab., 2021), abordando a vacínologia reversa, foram analisadas 5 cepas de *M. genitalium*. A partir de suas análises foram encontradas 104 proteínas conservadas e não homólogas ao hospedeiro. Essas proteínas foram levadas a análises para localização subcelular e suas propriedades antigênicas, verificando-se a probabilidade de adesão. A partir dessas análises, foram encontradas então 19 proteínas candidatas a novas vacinas para o combate a *Mycoplasma genitalium*.

1.7. *Haemophilus Ducreyi*

O *H. ducreyi* é agente causador do cancro mole, uma doença sexualmente transmissível (FINK D.L., 2006), que infecta preferencialmente o epitélio da mucosa, mas pode infectar também o epitélio escamoso estratificado queratinizado. Dentro de horas ou dias, são formadas pápulas eritematosas nos locais de entrada da bactéria. Em 2 ou 3 dias, as pápulas se desenvolvem formando pústulas. Após algumas semanas, as pústulas se tornam úlceras, acarretando em dor no local e podendo, em alguns casos, evoluir para linfadenopatia supurativa (CHEN e colab., 1997; HAMMOND e colab., 1980). O *H. ducreyi* é capaz de escapar da ação de fagócitos,

o que aparenta ser um mecanismo de evasão do sistema imune, importante fator na patogênese da infecção.

O cancro mole é de difícil controle, pois uma infecção por *H. ducreyi* parece não proteger contra infecções subsequentes. O que é sugestivo de uma resposta de hipersensibilidade tardia contra o *H. ducreyi*, que não confere proteção contra infecções subsequentes nem mesmo é efetiva em erradicar a infecção (COLE e colab., 2003).

Sarom et al (SAROM e colab., 2018), em um trabalho realizado em 2018, analisaram 28 genomas de diferentes cepas de *Haemophilus ducreyi*, abordando, entre outros temas a vacinologia reversa, verificando a existência ou não de potenciais alvos para a elaboração de novas vacinas. Nesse estudo, foram encontradas 1257 proteínas compartilhadas entre todas as 28 cepas, dessas, 847 foram consideradas não homólogas ao hospedeiro, e levadas adiante no estudo. Realizando uma primeira filtragem para potenciais alvos de vacina, os autores encontraram 31 proteínas com uma boa taxa de adesão, e em uma segunda filtragem, 13 foram consideradas como essenciais ao patógeno, sendo, assim, essas selecionadas como os alvos finais deste estudo, passíveis de posteriores trabalhos na área para a elaboração de novas vacinas.

1.8. Moraxella catarrhalis

A *Moraxella catarrhalis*, também conhecida como *Branhamella catarrhalis*, é um coco Gram-negativo que parasita exclusivamente humanos, coloniza o sistema respiratório superior de forma comensal e é a terceira maior causa de otite média (OM) após *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (EARL e colab., 2016; PARADYNSKI e colab., 2015). Por ser uma bactéria oportunista normalmente encontrada no trato respiratório superior, pode causar infecções como otite média aguda, sinusite, conjuntivite, bronquite crônica e pneumonia, além disso, é um patógeno nosocomial, representando 30% das infecções hospitalares (ABDULLAH e colab., 2013; SILVA, Carlos Henrique Pessôa De Menezes E, 2006).

Observou-se que a maioria das cepas de *M. catarrhalis* são resistentes à penicilina, (HOBAN e colab., 2001) logo, quando se trata um paciente com fármacos inespecíficos, acaba intensificando a resistência aos antimicrobianos, os tornando cada vez mais falhos e diminuindo as opções terapêuticas já existentes

(AUGUSTYNIAK e colab., 2018; PARADYNSKI e colab., 2015). Dada a importância da bactéria na saúde pública e a necessidade de controlar ou até mesmo erradicar a doença, foi empregado o método de vacinologia reversa com o intuito de identificar potenciais alvos para desenvolvimento de vacinas e esses alvos podem ser epítomos expostos na superfície bacteriana, antigenicidade, conservação de sequências ou expressão durante a infecção (D'MELLO e colab., 2019). Através de softwares específicos para estudos *in silico* e utilizando todo filtro para encontrar os potenciais alvos vacinais que se enquadram nos requisitos, Soltan e seus colaboradores identificaram apenas duas proteínas (LptD e BamA). A partir dessas duas proteínas, foi construído uma vacina multiepítomo considerando, de cada proteína, o perfil físico-químico, dinâmica molecular, a interação com o receptor TLR e a resposta imunológica gerada (SOLTAN e colab., 2021).

1.9. *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii (Ab) é uma bactéria Gram-negativa e ameaça emergente global responsável por infecções nosocomiais oportunistas, como pneumonia, bacteremia, meningite e infecções de tecidos moles (M. e colab., 2014). Como o *A. baumannii* é resistente a quase todos os antibióticos convencionais, é agora uma das 6 principais prioridades dos microrganismos perigosos listados pela *Infectious Disease Society of America* (SMITH, 2021).

A. baumannii pode aderir a superfícies secas por um longo tempo e está fortemente associado a infecções hospitalares, especialmente em unidades de terapia intensiva por meio de máquinas associadas à ventilação. *A. baumannii* é responsável por mais de 7.000 infecções hospitalares e mais de 500 mortes por ano apenas nos Estados Unidos (E e colab., 2017). Dada a importância deste patógeno, a estratégia de vacinologia reversa já foi adotada por vários trabalhos que, conjuntamente, já exploraram mais de 24 critérios computacionais diferentes usados para identificação e priorização de antígenos (MCCONNELL e MARTÍN-GALIANO, 2021). A maioria desses estudos empregou menos de 100 sequências de genoma para as quais foram avaliadas a prevalência intra-espécies, a localização da proteína e a antigenicidade celular e humoral. A previsão de toxicidade, alergenicidade e potencial autoimunidade do hospedeiro também foram incluídas por algumas abordagens. Dois

destes estudos (AHMAD e AZAM, 2018; SOLANKI e TIWARI, 2018) identificaram epítomos altamente conservados presentes em antígenos de membrana externa para o desenvolvimento de vacinas quiméricas multi-epítomos. Outro trabalho se concentrou na posição da rede de proteínas e na sua participação em diferentes processos fisiológicos (MUJAWAR e colab., 2019). Dois outros trabalhos relataram o uso da plataforma Vaxign para seleção de antígenos (HE e colab., 2010).

Além destes, em um estudo mais recente, Shadid *et al.* (2021) adotou uma estrutura computacional envolvendo pangenômica, proteômica subtrativa e estratégias de vaciniologia reversa, alcançando dois construtos de vacina quimérica com epítomos de células T e células B de potenciais candidatos a vacinas (SHAHID e colab., 2021); e, com base em estudos anteriores que identificaram antígenos em *A. baumannii*, McConnell (2021) empregou os conceitos de RV 2.0 na análise de dados proteômicos e computacionais fracionados de sequência do genoma de mais de 4.100 isolados de *A. baumannii*, aumentando o número de proteínas potencialmente acessíveis à resposta humoral para 8.824 proteínas não redundantes no pan-proteoma de *A. baumannii* (MCCONNELL e MARTÍN-GALIANO, 2021).

1.10. *Brucella Spp.*

Brucella spp. são bactérias Gram-negativas intracelulares facultativas que causam brucelose, uma doença infecciosa zoonótica que causa aborto e infertilidade nos animais afetados (FICHT, 2010; GEORGIOS PAPPAS, M.D., NIKOLAOS AKRITIDIS, M.D., MILE BOSILKOVSKI, M.D., AND EPAMEINONDAS TSIANOS, 2005). A infecção pode se espalhar de animais para humanos principalmente por meio da ingestão de leite não pasteurizado ou laticínios e, também, por meio do contato direto com animais infectados (AGASTHYA e colab., 2007). *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* e *Brucella suis* são as espécies patogênicas mais comuns desse gênero, causando a maioria dos casos de brucelose humana e veterinária (SMITS, 2013).

A doença é uma grave ameaça à saúde pública e à indústria pecuária em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento da Ásia Central, África, América do Sul e região do Mediterrâneo (MUSALLAM e colab., 2016), sendo atualmente considerada uma das doenças zoonóticas mais comuns em todo o mundo

(PAPPAS e colab., 2006). Embora vacinas veterinárias vivas atenuadas tenham sido empregadas e desempenhem um papel importante no controle de epidemias de brucelose (PÉREZ-SANCHO e colab., 2015), o combate à *Brucella spp.* permanece um desafio devido a algumas desvantagens apresentadas por esse tipo de vacina, *i.e.* interferência com testes diagnósticos, patogenicidade para humanos, potencial para causar aborto em animais gestantes (GOODWIN e PASCUAL, 2016).

Dada a necessidade de buscar por alternativas para o controle dessas infecções, o estudo de Yasmin e Ashhab aplicou métodos de vaciniologia reversa a fim de desenvolver uma vacina de subunidade segura e potente para superar as sérias desvantagens das vacinas vivas atenuadas de *Brucella spp.*, buscando candidatos a antígenos conservados entre as suas três principais espécies patogênicas (HISHAM e ASHHAB, 2018). Outro estudo adotou uma metodologia *in silico* para análise do proteoma central e de vaciniologia reversa para rastrear potenciais antígenos contra 213 cepas patogênicas de *Brucella spp.* com uma distribuição geográfica mundial, fornecendo um total de 32 potenciais antígenos protetores que podem contribuir para o desenvolvimento de uma futura vacina de amplo espectro contra *Brucella spp.* (ZAI e colab., 2021). Aslam *et al.* também foi bem sucedido em construir virtualmente uma vacina quimérica com o auxílio de imunoinformática para *B. melitensis* e, além disso, identificaram 23 novas proteínas como candidatos de drogas com base em seu papel nas vias metabólicas específicas do patógeno e no seus potenciais de drogabilidade (ASLAM e colab., 2020).

1.11. *Campylobacter Spp.*

Campylobacter spp. é a principal causa de gastroenterite bacteriana humana e de doenças diarreicas transmitidas por alimentos em todo o mundo, e a incidência de campilobacteriose em humanos aumentou consideravelmente nas últimas décadas (BURNHAM e HENDRIXSON, 2018; YOUNG e colab., 2007). Apenas na Europa, estima-se que 9 milhões de pessoas sejam afetadas por ano, com um custo de cerca de 2,4 bilhões de euros (GILLESPIE, Iain A. e colab., 2002). Dentre tais infecções, *Campylobacter jejuni* é responsável por 90% dos casos e *Campylobacter coli* é responsável por 10%, aproximadamente (“The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in

2012”, 2014). Além disso, como *C. jejuni* tem uma ampla gama de hospedeiros, essa espécie causa alta morbidade em humanos e em algumas espécies de aves (CROFTS e colab., 2018; KAAKOUSH e colab., 2015). Além disso, a campilobacteriose é um dos fatores de risco mais comuns para o desenvolvimento da doença inflamatória intestinal (DII) e da síndrome de Guillain-Barre (GBS) que leva a danos nos nervos, paralisia muscular e, às vezes, morte (ST CHARLES e colab., 2017).

Estudos recentes demonstraram o desenvolvimento de multirresistência em *Campylobacter spp.* contra fluoroquinolonas, tetraciclina e eritromicina (KAYMAN e colab., 2019; NOREEN e colab., 2020), levando a OMS a listar a *Campylobacter spp.* como uma séria ameaça à saúde pública global (SILVA, Joana e colab., 2011). Além disso, o desenvolvimento de multirresistência pode reduzir a eficácia de vários medicamentos contra campilobacteriose e, portanto, o desenvolvimento de novas vacinas pode ser uma das estratégias alternativas para prevenir efetivamente a infecção e evitar o uso de antibióticos (HILL e colab., 2016).

Para enfrentar ameaças de impacto global como essa, a vacínologia reversa tem sido aplicada na geração de candidatos à vacinas para muitos patógenos, incluindo linhagens de *Campylobacter spp.* (HASSAN e colab., 2016). O primeiro trabalho a aplicar RV ao gênero escolheu o genoma da altamente virulenta cepa 81-176 de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* para identificar novos antígenos vacinais em potencial (MEUNIER e colab., 2016). No estudo de Jain *et al.*, o genoma da cepa NCTC 11168 de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* sorotipo O:2 foi analisado por uma abordagem computacional de mapeamento de epítomos para prospectar por vacinas candidatas promissoras, revelando o epítomo AMLTYMQWL do antígeno Q0PA22 como um promissor candidato para eliciar a imunogenicidade para todas as populações alvo estudadas (JAIN e colab., 2019).

Mais recentemente, Zeb *et al.* reportou a construção de uma vacina de subunidade de múltiplos epítomos que desencadeou a liberação de fatores imunológicos primários e secundários por simulação *in silico*. Tal estudo utilizou um pipeline de proteômica subtrativa para priorizar proteínas essenciais, que conferem um papel crítico na virulência, contudo, apenas o proteoma completo da cepa NTCT11186 de *C. jejuni* foi levada em consideração nas análises (ZEB e colab., 2021). Um estudo mais completo conduzido por Cao *et al.* investigou o pangenoma

de 173 cepas de *C. jejuni*, observando também a filogênese e os genes do fator de virulência das linhagens, e alcançou uma seleção final de cinco proteínas centrais de VF com alta antigenicidade como potenciais alvos de vacinas para humanos. Além disso, uma análise de transcriptoma em células humanas e da alça intestinal de suínos comprovou que esses genes-alvo de vacina são importantes na virulência de *C. jejuni* em diferentes hospedeiros (CAO e colab., 2021)

1.12. *Vibrio Spp.*

O gênero *Vibrio* representa um conjunto de bactérias Gram-negativas em forma de bastonetes, geralmente associados às principais doenças nos sistemas aquáticos e ao consumo de frutos do mar (CRAIG BAKER-AUSTIN, JAMES D. OLIVER, MUNIRUL ALAM, AFSAR ALI, MATTHEW K. WALDOR, 2018). Suas principais representantes desse grupo são *Vibrio anguillarum*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae*, sendo a primeira relacionada com doenças septicêmicas hemorrágicas fatais (FRANS e colab., 2011), a segunda a infecções gastrointestinais no geral (LETCHUMANAN e colab., 2014) e a terceira, causadora da cólera (OPREA e colab., 2020).

Em 2018 Pallavi Baliga *et al.* (BALIGA e colab., 2018) aplicaram a vacinação reversa no descobrimento de alvos vacinais para o patógeno *V. anguillarum*, focando principalmente em OMPs (proteínas de membrana externa), visto que essas são adesinas por natureza e participam da patogenicidade da bactéria. Ao final, conseguiram identificar 23 candidatos vacinais com capacidade de atuarem como adesinas, além de serem previstas como antigênicas pelos *softwares* Vaxign e Vaxijen. Depois ainda trabalharam com a predição de epítomos de células B e T, para construção de vacinas quiméricas multiepítomo.

Em 2021, Wenbin Wang *et al.* (WANG e colab., 2021) abordaram a vacinação reversa, em busca de alvos vacinais de membrana externa para a espécie referência *V. parahaemolyticus* (Vp), mas que também estivessem presentes em outros patógenos do gênero. Para isto, utilizaram entre outras ferramentas, o SignalP5.0, CELLO e PSORTb, para avaliar presença de peptídeo sinal, e localização subcelular, e da mesma forma que para *V. anguillarum*, foi utilizado Vaxign e Vaxijen para avaliar antigenicidade e capacidade de adesão. Ao final, concluíram que 14 OMPs estão

conservadas entre as espécies e simultaneamente em *V. parahaemolyticus* (via BLAST).

Assim, em 2019, (RASHID e colab., 2019) aplicaram a vacinação reversa como técnica para a identificação de proteínas essenciais, acessíveis, virulentas e imunogênicas contra a espécie de *V. cholerae*. Além disso seus epítomos foram filtrados para localização daqueles de melhor ligação com os alelos de MHC. Diferentemente das duas abordagens anteriores, como resultado, identificaram apenas duas proteínas de membrana externa (OmpW e OmpU), uma lipoproteína (*NlpD*), e, um fator de colonização acessório (*AcfA*), além de uma porina putativa como bons alvos vacinais.

2. CONCLUSÃO

Como já foi demonstrado em outro capítulo, a vacinação reversa é uma área de estudo que busca compreender as funções e identificar e selecionar antígenos dos microrganismos que possuem uma capacidade de proteção imunológica. Esse conceito se aplica através de várias metodologias computacionais e que conseqüentemente vão poder deixar todo o processo de pesquisa, desenvolvimento e distribuição de uma vacina com mais qualidade, mais rápido, mais seguro e mais barato.

Observando todos os estudos aqui apresentados, pudemos observar que o uso indiscriminado de antibióticos causa a seleção de muitas bactérias resistentes à diversas formas de tratamento, e então mostrando que a vacina, como já descrito na literatura, é considerada como o melhor método de prevenção para as doenças. E, todos os achados aqui mostrados, sejam eles achados de potenciais alvos vacinais para infecções de humanos ou outros animais, serão importantes para alavancar os estudos e conseqüentemente, serem usados como grandes potenciais na criação de novas vacinas protetoras.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, Farhan Essa e AHUJA, Keerat Rai e KUMAR, Hanesh. **Prevalence and emerging resistance of *Moraxella catarrhalis* in lower respiratory tract infections in Karachi**. Journal of the Pakistan Medical Association, v. 63, n. 11, p. 1342–1344, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24392515/>>.

ADHIKARI, Rahi e colab. **UgpB, a periplasmic component of the UgpABCE ATP-binding cassette transporter, predominantly follows the Sec translocation pathway**. Meta Gene, v. 13, p. 129–139, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mgene.2017.06.002>>.

AGASTHYA, A. S. e ISLOOR, S. e PRABHUDAS, K. **Brucellosis in high risk group individuals**. Indian Journal of Medical Microbiology, v. 25, n. 1, p. 28–31, 2007. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0255-0857\(21\)02230-1](https://doi.org/10.1016/S0255-0857(21)02230-1)>.

AHMAD, Sajjad e AZAM, Syed Sikander. **A novel approach of virulome based reverse vaccinology for exploring and validating peptide-based vaccine candidates against the most troublesome nosocomial pathogen: *Acinetobacter baumannii***. Journal of Molecular Graphics and Modelling, v. 83, p. 1–11, 2018. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2018.04.020>>.

ASLAM, Muneeba e colab. **Potential druggable proteins and chimeric vaccine construct prioritization against *Brucella melitensis* from species core genome data**. Genomics, v. 112, n. 2, p. 1734–1745, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.10.009>>.

AUGUSTYNIAK, Daria e colab. **Virulence factors of *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles are major targets for cross-reactive antibodies and have adapted during evolution**. Scientific Reports, v. 8, n. 1, 2018. Disponível em: <doi.org/10.1038/s41598-018-23029-7>.

AZAD, Abdu F. e RADULOVIC, Suzana. **Pathogenic rickettsiae as bioterrorism agents**. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 990, p. 734–738, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07452.x>>.

BALIGA, Pallavi e SHEKAR, Malathi e VENUGOPAL, Moleyr Nagarajappa. **Potential Outer Membrane Protein Candidates for Vaccine Development Against the Pathogen *Vibrio anguillarum*: A Reverse Vaccinology Based Identification**. Current Microbiology, v. 75, n. 3, p. 368–377, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00284-017-1390-z>>.

BARKOFF, Alex Mikael e colab. **Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates: Evidence of increased circulation in Europe, 1998 to 2015**. Eurosurveillance, v. 24, n. 7, 2019. Disponível em: <[10.2807 / 1560-7917.ES.2019.24.7.1700832](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.7.1700832)>.

BART, Marieke J. e colab. **Comparative genomics of prevaccination and modern *Bordetella pertussis* strains**. BMC Genomics, v. 11, n. 1, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-627>>.

BOS, Martine P. e colab. **Involvement of *Neisseria meningitidis* lipoprotein GNA2091 in the assembly of a subset of outer membrane proteins**. Journal of Biological Chemistry, v. 289, n. 22, p. 15602–15610, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.539510>>.

BRADSHAW, Catriona S. e JENSEN, Jorgen S. e WAITES, Ken B. **New Horizons in *Mycoplasma genitalium* Treatment**. Journal of Infectious Diseases, v. 216, p. S412–S419, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/infdis/jix132>>.

BURNHAM, Peter M. e HENDRIXSON, David R. **Campylobacter jejuni: collective components promoting a successful enteric lifestyle**. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 9, p. 551–565, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0037-9>>.

CAO, Hengchun e colab. **Multi-Omics Approach Reveals the Potential Core Vaccine Targets for the Emerging Foodborne Pathogen Campylobacter jejuni**. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.665858>>.

CARO-GOMEZ, Erika e colab. **Discovery of novel cross-protective Rickettsia prowazekii T-cell antigens using a combined reverse vaccinology and in vivo screening approach**. *Vaccine*, v. 32, n. 39, p. 4968–4976, 2014. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.06.089>>.

CHEN, Cheng Yen e colab. **Comparison of enzyme immunoassays for antibodies to Haemophilus ducreyi in a community outbreak of chancroid in the United States**. *Journal of Infectious Diseases*, v. 175, n. 6, p. 1390–1395, 1997. Disponível em: <10.1086/516471>.

CHOKKAKULA, Santosh e colab. **Molecular surveillance of antimicrobial resistance and transmission pattern of Mycobacterium leprae in Chinese leprosy patients**. *Emerging Microbes and Infections*, v. 8, n. 1, p. 1479–1489, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1677177>>.

CODY, C. L. e colab. **Nature and rates of adverse reactions associated with DTP and DT immunizations in infants and children**. *Pediatrics*, v. 68, n. 5, p. 650–660, 1981. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7031583/>>.

COLE, Leah E. e colab. **A Humoral Immune Response Confers Protection against Haemophilus ducreyi Infection**. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 12, p. 6971–6977, 2003. Disponível em: <10.1128/IAI.71.12.6971-6977.2003>.

CRAIG BAKER-AUSTIN, JAMES D. OLIVER, MUNIRUL ALAM, AFSAR ALI, MATTHEW K. WALDOR, Firdausi Qadri & Jaime Martinez-Urtaza. **Vibrio spp. infections**. *Nature reviews. Disease primers*, v. 4, n. 1, p. 7, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41572-018-0005-8>>.

CROFTS, Alexander A. e colab. **Campylobacter jejuni transcriptional and genetic adaptation during human infection**. *Nature Microbiology*, v. 3, n. 4, p. 494–502, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41564-018-0133-7>>.

DA ROCHA-LIMA H. Zur **Aetiologie des Fleckfiebers**. *Berl Klin Wochenschr* 1916; 53:567–569.

D'MELLO, Adonis e colab. **ReVac: A reverse vaccinology computational pipeline for prioritization of prokaryotic protein vaccine candidates**. *BMC Genomics*, v. 20, n. 1, 2019. Disponível em: <doi.org/10.1186/s12864-019-6195-y>.

DECKER, M. D. e colab. **Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: Adverse reactions**. *Pediatrics*, v. 96, n. 3 II SUPPL., p. 557–566, 1995. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7659476/>>.

DEPS, Patrícia e COLLIN, Simon M. **Mycobacterium lepromatosis as a Second Agent of Hansen's Disease**. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.698588>>.

DIOP, Awa e colab. **Genome sequence-based criteria for demarcation and definition of species in the genus rickettsia.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 70, n. 3, p. 1738–1750, 2020. Doi: <<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003963>>.

DOMÍNGUEZ-GIL, Teresa e colab. **Renew or die: The molecular mechanisms of peptidoglycan recycling and antibiotic resistance in Gram-negative pathogens.** Drug Resistance Updates, v. 28, p. 91–104, 2016. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.07.002>>.

E, Tacconelli e colab. **Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis.** The Lancet Infectious Diseases, v. 17, 2017. Disponível em: <[10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)>.

EARL, Joshua P. e colab. **Comparative genomic analyses of the moraxella catarrhalis serosensitive and seroresistant lineages demonstrate their independent evolution.** Genome Biology and Evolution, v. 8, n. 4, p. 955–974, 2016. Disponível em: <[doi:10.1093/gbe/evw039](https://doi.org/10.1093/gbe/evw039)>.

FELICE, Andrei G. e SANTOS, Leonardo N.Q. e colab. **Comparative genomics of Bordetella pertussis and prediction of new vaccines and drug targets.** Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1898473>>.

FELICE, Andrei G. e ALVES, Leandro G. e colab. **Pan-genomic analyses of 47 complete genomes of the Rickettsia genus and prediction of new vaccine targets and virulence factors of the species.** Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1898473>>.

FERNÁNDEZ-HUERTA, Miguel e ESPASA, Mateu. **Mycoplasma genitalium co-infection with Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae among asymptomatic patients: The silent wick for macrolide resistance spread.** Sexually Transmitted Infections, v. 95, n. 5, p. 391, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1136/sextrans-2018-053848>>.

FERREIRA, Roumayne L. e colab. **Characterization of KPC-Producing Serratia marcescens in an Intensive Care Unit of a Brazilian Tertiary Hospital.** Frontiers in Microbiology, v. 11, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00956>>.

FICHT, Thomas. **Brucella taxonomy and evolution.** Future Microbiology, v. 5, n. 6, p. 859–866, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.2217/fmb.10.52>>.

FINK D.L., Geme J.W. **The Genus Haemophilus.** The Prokaryotes, p. 3304–3330, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_40>.

FRANS, I. e colab. **Vibrio anguillarum as a fish pathogen: Virulence factors, diagnosis and prevention.** Journal of Fish Diseases, v. 34, n. 9, p. 643–661, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01279.x>>.

GEORGIOS PAPPAS, M.D., NIKOLAOS AKRITIDIS, M.D., MILE BOSILKOVSKI, M.D., AND EPAMEINONDAS TSIANOS, M.D. **Brucellosis.** N Engl J Med, v. 352, p. 2325–2336, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1056/NEJMra050570>>.

GILLESPIE, Iain A. e colab. **A case-case comparison of Campylobacter coli and Campylobacter jejuni infection: A tool for generating hypotheses.** Emerging Infectious Diseases, v. 8, n. 9, p. 937–942, 2002. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/9/01-0187_article>.

GILLESPIE, Joseph J. e colab. **Plasmids and Rickettsial evolution: Insight from Rickettsia felis.** PLoS ONE, v. 2, n. 3, 2007. Disponível em: <[doi: 10.1371/journal.pone.0000266](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000266)>.

GOODWIN, Zakia I. e PASCUAL, David W. **Brucellosis vaccines for livestock**. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 181, p. 51–58, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.03.011>>.

HAMBRIDGE, Thomas e colab. **Mycobacterium leprae transmission characteristics during the declining stages of leprosy incidence: A systematic review**. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 15, n. 5, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009436>>.

HAMMOND, G. W. e colab. **Epidemiologic, clinical, laboratory, and therapeutic features of an urban outbreak of chancroid in North America**. *Reviews of infectious diseases*, v. 2, n. 6, p. 867–879, 1980. Disponível em: <10.1093/clinids/2.6.867>.

HARRISON, Sally A. e colab. **Mycoplasma genitalium Coinfection in Women With Chlamydia trachomatis Infection**. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 46, n. 10, p. E101–E104, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/olq.0000000000001028>>.

HASSAN, Afreenish e colab. **Pangenome and immuno-proteomics analysis of Acinetobacter baumannii strains revealed the core peptide vaccine targets**. *BMC Genomics*, v. 17, n. 1, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12864-016-2951-4>>.

HE, Yongqun e XIANG, Zuoshuang e MOBLEY, Harry L.T. **Vaxign: The first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vaccine development**. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2010, 2010.

HILL, Andrew B. e colab. **Improving global vaccine accessibility**. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 42, p. 67–73, 2016. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.03.002>>.

HISHAM, Yasmin e ASHHAB, Yaqoub. **Identification of cross-protective potential antigens against pathogenic brucella spp. through combining pan-genome analysis with reverse vaccinology**. *Journal of Immunology Research*, v. 2018, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2018/1474517>>.

HOBAN, D. J. e colab. **Worldwide prevalence of antimicrobial resistance in Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, and Moraxella catarrhalis in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999**. *Clinical Infectious Diseases*, v. 32, n. 10 SUPPL. 2, 2001. Disponível em: <doi: 10.1086/320181>.

J.S., Jensen e C., Bradshaw. **Management of Mycoplasma genitalium infections - can we hit a moving target?** *BMC Infectious Diseases*, v. 15, n. 1, 2015. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L605639404%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1186/s12879-015-1041-6>>.

JAIN, Richa e colab. **Genome-Wide Prediction of Potential Vaccine Candidates for Campylobacter jejuni Using Reverse Vaccinology**. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, v. 11, n. 3, p. 337–347, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12539-017-0260-5>>.

JAISWAL, Arun Kumar e colab. **An in silico identification of common putative vaccine candidates against treponema pallidum: A reverse vaccinology and subtractive genomics based approach**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 2, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms18020402>>.

JAISWAL, Arun Kumar e colab. **Reverse vaccinology and subtractive genomics approaches for identifying common therapeutics against Mycobacterium leprae and Mycobacterium**

lepromatosis. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, v. 27, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0027>>.

JAISWAL, Arun Kumar e colab. **The pan-genome of *Treponema pallidum* reveals differences in genome plasticity between subspecies related to venereal and non-venereal syphilis.** BMC Genomics, v. 21, n. 1, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12864-019-6430-6>>.

JENSEN, J. S. e colab. **Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples.** Journal of Clinical Microbiology, v. 29, n. 1, p. 46–50, 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/jcm.29.1.46-50.1991>>.

KAAKOUSH, Nadeem O. e colab. **Global epidemiology of campylobacter infection.** Clinical Microbiology Reviews, v. 28, n. 3, p. 687–720, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/CMR.00006-15>>.

KAYMAN, Tuba e colab. **Antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolates recovered from humans with diarrhoea in Turkey.** Journal of Medical Microbiology, v. 68, n. 2, p. 136–142, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/jmm.0.000890>>.

KORAIMANN, G. **Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria.** Cellular and Molecular Life Sciences, v. 60, n. 11, p. 2371–2388, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00018-003-3056-1>>.

KREGER, A. S. e colab. **Immunization against experimental *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* keratitis. Vaccination with lipopolysaccharide endotoxins and proteases.** Investigative Ophthalmology and Visual Science, v. 27, n. 6, p. 932–939, 1986. Disponível em: <<https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2159894>>.

KUMAGAI, Y. e OKADA, K. e SAWAE, Y. **The effect of humoral and cell-mediated immunity in resistance to systemic *serratia* infection.** Journal of Medical Microbiology, v. 36, n. 4, p. 245–249, 1992. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/00222615-36-4-245>>.

LETCHUMANAN, Vengadesh e CHAN, Kok Gan e LEE, Learn Han. ***Vibrio parahaemolyticus*: A review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques.** Frontiers in Microbiology, v. 5, n. DEC, 2014. Disponível em: <[10.3389 / fmicb.2014.00705](https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00705)>.

LEW-TABOR, A. E. e RODRIGUEZ VALLE, M. **A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases.** Ticks and Tick-borne Diseases, v. 7, n. 4, p. 573–585, 2016. Doi <<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.12.012>>.

M., Behnia e colab. **Nosocomial and ventilator-associated pneumonia in a community hospital intensive care unit: a retrospective review and analysis.** BMC research notes, v. 7, p. 232, 2014.

M.L., Cristina e M., Sartini e A.M., Spagnolo. ***Serratia marcescens* infections in neonatal intensive care units (NICUs).** International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 16, n. 4, 2019.

MAHLANGU, Mahlape P. e colab. **The Prevalence of *Mycoplasma genitalium* and Association with Human Immunodeficiency Virus Infection in Symptomatic Patients, Johannesburg, South Africa, 2007-2014.** Sexually Transmitted Diseases, v. 46, n. 6, p. 395–399, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/olq.0000000000000984>>.

MAHLEN, Steven D. **Serratia infections: From military experiments to current practice.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 24, n. 4, p. 755–791, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21976608/>>.

MCCONNELL, Michael J. e MARTÍN-GALIANO, Antonio J. **Designing Multi-Antigen Vaccines Against Acinetobacter baumannii Using Systemic Approaches.** *Frontiers in Immunology*, v. 12, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.666742>>.

MCGOWIN, Chris L. e TOTTEN, Patricia A. **The Unique Microbiology and Molecular Pathogenesis of Mycoplasma genitalium.** *Journal of Infectious Diseases*, v. 216, p. S382–S388, 2017. Disponível em: <10.1093/infdis/jix172>.

MELVIN, Jeffrey A. e colab. **Bordetella pertussis pathogenesis: Current and future challenges.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 12, n. 4, p. 274–288, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrmicro3235>>.

MEUNIER, Marine e colab. **Identification of novel vaccine candidates against campylobacter through reverse vaccinology.** *Journal of Immunology Research*, v. 2016, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2016/5715790>>.

MUJAWAR, Shama e colab. **Delineating the plausible molecular vaccine candidates and drug targets of multidrug-resistant acinetobacter baumannii.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 9, n. JUN, 2019. Doi <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00203>>.

MUSALLAM, I. I. e colab. **Systematic review of brucellosis in the Middle East: Disease frequency in ruminants and humans and risk factors for human infection.** *Epidemiology and Infection*, v. 144, n. 4, p. 671–685, 2016. Doi: <<https://doi.org/10.1017/S0950268815002575>>.

NAPIERALA MAVEDZENGE, Sue e colab. **Mycoplasma genitalium is associated with increased genital HIV type 1 RNA in zimbabwean women.** *Journal of Infectious Diseases*, v. 211, n. 9, p. 1388–1398, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/infdis/jiu644>>.

NOGUEIRA, Wylerson G. e colab. **Computational identification of putative common genomic drug and vaccine targets in Mycoplasma genitalium.** *Genomics*, v. 113, n. 4, p. 2730–2743, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.06.011>>

NOREEN, Zobia e colab. **Transmission of multidrug-resistant Campylobacter jejuni to children from different sources in Pakistan.** *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 20, p. 219–224, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.07.018>>.

OPREA, Mihaela e colab. **The seventh pandemic of cholera in Europe revisited by microbial genomics.** *Nature Communications*, v. 11, n. 1, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-020-19185-y>>.

PALMER, Guy H. e colab. **Genome-wide screening and identification of antigens for rickettsial vaccine development.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 64, n. 1, p. 115–119, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00878.x>>.

PALMER, H. **Development and evaluation of the polymerase chain reaction to detect Mycoplasma genitalium.** *FEMS Microbiology Letters*, v. 77, n. 2–3, p. 199–203, 1991. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0378-1097\(91\)90551-k](https://doi.org/10.1016/0378-1097(91)90551-k)>.

PAPPAS, Georgios e colab. **The new global map of human brucellosis.** *Lancet Infectious Diseases*, v. 6, n. 2, p. 91–99, 2006. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(06\)70382-6](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(06)70382-6)>.

PARADYNSKI, Geane Andriollo e colab. **De Microrganismos Isolados Em Infecções Do Trato Respiratório Em Um Hospital No Interior Do Estado Do Rio Grande Do Sul.**

PÉREZ-SANCHO, Marta e colab. **Control of Animal Brucellosis — The Most Effective Tool to Prevent Human Brucellosis.** Updates on Brucellosis, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.5772/61222>>.

PRADO, Ligia Carolina da Silva e colab. **New putative therapeutic targets against *Serratia marcescens* using reverse vaccinology and subtractive genomics.** Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1942211>>.

RAPPUOLI, Rino. **Reverse Vaccinology.** Current Opinion in Microbiology, v. 3, n. 5, p. 445–450, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00119-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00119-3)>.

RASHID, Muhammad I. e colab. **Fishing for vaccines against *Vibrio cholerae* using in silico pan-proteomic reverse vaccinology approach.** PeerJ, v. 2019, n. 6, 2019. Disponível em: <[10.7717 / peerj.6223](https://doi.org/10.7717/peerj.6223)>.

REEVES, S. A. e TORRES, A. G. e PAYNE, S. M. **TonB is required for intracellular growth and virulence of *Shigella dysenteriae*.** Infection and Immunity, v. 68, n. 11, p. 6329–6336, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/IAI.68.11.6329-6336.2000>>.

SARALEGUI, Claudia e colab. **Genomics of *Serratia marcescens* Isolates Causing Outbreaks in the Same Pediatric Unit 47 Years Apart: Position in an Updated Phylogeny of the Species.** Frontiers in Microbiology, v. 11, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00451>>.

SAROM, Alissa De e colab. **Putative vaccine candidates and drug targets identified by reverse vaccinology and subtractive genomics approaches to control *Haemophilus ducreyi*, the causative agent of chancroid.** Journal of the Royal Society Interface, v. 15, n. 142, 2018. Disponível em: <[10.1098/rsif.2018.0032](https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0032)>.

SERRUTO, Davide e colab. **The new multicomponent vaccine against meningococcal serogroup B, 4CMenB: Immunological, functional and structural characterization of the antigens.** Vaccine, v. 30, n. SUPPL. 2, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.033>>.

SHAHID, Fatima e colab. **Chimeric vaccine designs against *Acinetobacter baumannii* using pan genome and reverse vaccinology approaches.** Scientific Reports, v. 11, n. 1, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-021-92501-8>>.

SHANKS, Robert M.Q. e colab. **Identification of *slpB*, a cytotoxic protease from *Serratia marcescens*.** Infection and Immunity, v. 83, n. 7, p. 2907–2916, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/IAI.03096-14>>.

SILVA, Carlos Henrique Pessôa de Menezes e. **Susceptibilidade de antimicrobiana de *Moraxella catarrhalis* isolada de infecções do trato respiratório TT - Antibiotic-susceptibility of *Moraxella catarrhalis* isolated from respiratory tract infections.** Disponível em: <<http://sbac.org.br/rbac/004/50.pdf>>.

SILVA, Joana e colab. ***Campylobacter* spp. As a foodborne pathogen: A review.** Frontiers in Microbiology, v. 2, n. SEP, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00200>>.

SMITH, Orla M. **Vaccines and antibiotic resistance.** Science, v. 373, n. 6556, p. 755, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.08.002>>.

SMITS, H. L. **Brucellosis in pastoral and confined livestock: Prevention and vaccination.** OIE Revue Scientifique et Technique, v. 32, n. 1, p. 219–228, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.20506/rst.32.1.2200>>.

SOLANKI, Vandana e TIWARI, Vishvanath. **Subtractive proteomics to identify novel drug targets and reverse vaccinology for the development of chimeric vaccine against *Acinetobacter baumannii*.** Scientific Reports, v. 8, n. 1, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-018-26689-7>>.

SOLTAN, Mohamed A. e colab. **In silico prediction of a multipeptide vaccine against moraxella catarrhalis: Reverse vaccinology and immunoinformatics.** Vaccines, v. 9, n. 6, 2021. Disponível em: <doi.org/10.3390/vaccines9060669>.

ST CHARLES, J. L. e colab. **Guillain Barré Syndrome is induced in Non-Obese Diabetic (NOD) mice following *Campylobacter jejuni* infection and is exacerbated by antibiotics.** Journal of Autoimmunity, v. 77, p. 11–38, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2016.09.003>>.

STORK, Michiel e colab. **An outer membrane receptor of *Neisseria meningitidis* involved in zinc acquisition with vaccine potential.** PLoS Pathogens, v. 6, n. 7, p. 1–10, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000969>>.

TAYLOR-ROBINSON, David. **Diagnosis and antimicrobial treatment of *Mycoplasma genitalium* infection: Sobering thoughts.** Expert Review of Anti-Infective Therapy, v. 12, n. 6, p. 715–722, 2014. Disponível em: <[10.1586/14787210.2014.919220](https://doi.org/10.1586/14787210.2014.919220)>.

TAYLOR-ROBINSON, David e JENSEN, Jørgen Skov. ***Mycoplasma genitalium*: From chrysalis to multicolored butterfly.** Clinical Microbiology Reviews, v. 24, n. 3, p. 498–514, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/CMR.00006-11>>.

The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. EFSA Journal, v. 12, n. 2, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2016.09.003>>.

TINDBERG, Ylva e BLENNOW, Margareta e GRANSTRÖM, Marta. **A ten year follow-up after immunization with a two component acellular pertussis vaccine.** Pediatric Infectious Disease Journal, v. 18, n. 4, p. 361–365, 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/00006454-199904000-00011>>.

TULLY, Joseph G. e colab. **a Newly Discovered *Mycoplasma* in the Human Urogenital Tract.** The Lancet, v. 317, n. 8233, p. 1288–1291, 1981. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/S0140-6736%2881%2992461-2>>.

WANG, Wenbin e colab. **Identification of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio* spp. Specific Outer Membrane Proteins by Reverse Vaccinology and Surface Proteome.** Frontiers in Microbiology, v. 11, 2021. Disponível em: <[10.3389/fmicb.2020.625315](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.625315)>.

WEISS E, MOULDER JW, Order I. Rickettsiales Gieszczkiewicz 1939. In Bergey DH, Krieg NR, Holt JG. (editors) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Baltimore, MD: Williams & Wilkins; 1984 pp 687–703.**

WIRSING VON KÖNIG, C. H. e colab. **Pertussis of adults and infants.** Lancet Infectious Diseases, v. 2, n. 12, p. 744–750, 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(02\)00452-8](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(02)00452-8)>.

WORKOWSKI, Kimberly A. e BOLAN, Gail A. **Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015**. MMWR Recommendations and Reports, v. 64, n. 3, p. 1–138, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5885289/>>.

WU, Yen Mu e colab. **Serratia marcescens meningitis: Epidemiology, prognostic factors and treatment outcomes**. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, v. 46, n. 4, p. 259–265, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jmii.2012.07.006>>.

YOUNG, Kathryn T. e DAVIS, Lindsay M. e DIRITA, Victor J. **Campylobacter jejuni: Molecular biology and pathogenesis**. Nature Reviews Microbiology, v. 5, n. 9, p. 665–679, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrmicro1718>>.

ZAI, Xiaodong e colab. **Screening of potential vaccine candidates against pathogenic Brucella spp. using composite reverse vaccinology**. Veterinary Research, v. 52, n. 1, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13567-021-00939-5>>.

ZEB, Adnan e colab. **Genome-wide screening of vaccine targets prioritization and reverse vaccinology aided design of peptides vaccine to enforce humoral immune response against Campylobacter jejuni**. Computers in biology and medicine, v. 133, p. 104412, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2021.104412>>.

CAPÍTULO 09

**Candidatos Vacinais Para Leishmaniose Visceral Humana:
Breve Abordagem Sobre As Novas Perspectivas**

Priscilla Elias Ferreira da Silva¹
Loren Queli Pereira²
Helio Moraes-Souza³

¹Doutoranda no programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

²Doutoranda no programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

³Professor Titular da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

RESUMO:

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa e parasitária causada por parasitos do gênero *Leishmania*. São transmitidas por insetos fêmeas de diferentes espécies da família Phlebotominae e as principais espécies envolvidas na transmissão da LV humana são: *Leishmania (L.) infantum* e *Leishmania (L.) donovani*. Estima-se a ocorrência de 50.000 a 90.000 novos casos agudos de LV por ano no mundo, a maioria dos quais ocorrem no Brasil, África Oriental e Índia. Assim, a enfermidade pode ser encontrada em áreas tropicais e subtropicais, ocupando um lugar importante entre as doenças tropicais e negligenciadas, afetando, sobretudo, populações mais vulneráveis econômica e socialmente. Embora seja conhecida e estudada há mais de um século, a LV é considerada uma doença reemergente configurando-se também em um grande problema de saúde pública, uma vez que possui ampla complexidade biológica, clínica e epidemiológica. No que se refere ao diagnóstico confirmatório, este ainda apresenta lacunas. Por fim, quanto ao tratamento da doença, ainda existem dificuldades a serem superadas como a produção de medicamentos eficazes e com baixa toxicidade. Nesse sentido, mesmo com os inúmeros avanços no campo da vacinologia e entendimento da resposta imune frente à LV humana, não dispomos na atualidade de vacinas para nenhuma das formas da doença. Portanto, iniciativas conjuntas estão sendo realizadas com intuito de identificar antígenos capazes de conferir imunidade protetora contra a LV. Desse modo, este capítulo tem como objetivo apresentar os principais candidatos vacinais para a leishmaniose visceral humana, bem como realizar uma breve abordagem sobre as novas perspectivas.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral humana. Vacina. Desenvolvimento de vacinas. Candidatos vacinais.

1. ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa e parasitária causada por parasitos do gênero *Leishmania*. São transmitidas por insetos fêmeas de diferentes espécies da família Phlebotominae (Pena, 1934; Meira; Jamra; Lima, 1948; Pessoa; Barreto, 1948; Lainson; Shaw, 1987; Lainson; Shaw, 1992; Araujo-Pereira et al., 2018; Da-Cruz; Pirmez, 2018). A enfermidade pode ser encontrada em áreas tropicais e subtropicais e ocupa lugar importante entre as doenças tropicais negligenciadas (DTN), afetando, sobretudo, populações mais vulneráveis econômica e socialmente (PAHO, 2019, 2020). As principais espécies envolvidas na transmissão da LV humana são: *Leishmania (L.) infantum* e *Leishmania (L.) donovani* (Chagas et al., 1937; Shaw, 2002; Maroli et al., 2013; Silva; Prata, 2018).

Embora seja conhecida e estudada desde 1903 (Ross, 1903; Chagas et al., 1937; Lainson, 2010), a leishmaniose visceral é considerada uma doença reemergente e se configura em um grande problema de saúde pública, uma vez que possui ampla complexidade biológica, clínica e epidemiológica (Prata, 1957; Castellano, 2005; WHO, 2017). Atinge países em desenvolvimento, principalmente populações menos favorecidas, sendo fundamentais esforços coletivos e governamentais para realização do seu controle (Prata, 1957). A LV é a forma clínica mais grave das leishmanioses devido às frequentes complicações e potenciais de evolução para óbito se não tratada em tempo oportuno (Deane; Deane, 1962; PAHO, 2020; Maia-Elkhoury et al; 2021). Para que o indivíduo acometido por LV possa ter um bom prognóstico, é necessário que o diagnóstico seja precoce, e isso vale para todas as doenças infecciosas e parasitárias.

A LV, também conhecida como calazar, é a forma clínica mais grave, usualmente fatal, se não tratada, em mais de 95% dos casos (WHO, 2021). Os acometidos apresentam sinais que sugerem a suspeita clínica, dentre eles a febre, a hepatoesplenomegalia, a pancitopenia e o emagrecimento. A esplenomegalia é o primeiro sinal indicativo para esta hipótese e quando está acompanhada pela febre e pela anemia, tem-se a configuração da chamada “tríade clássica” da doença (Badaró et al., 1986; Prata, 1957; Silva et al., 2013; Silva; Prata, 2018).

Atualmente, o diagnóstico confirmatório da LV ainda apresenta lacunas devido aos riscos para o paciente e à dificuldade de localizar os parasitos que se encontram

no interior de macrófagos/monócitos do sistema fagocítico mononuclear. Assim, a confirmação parasitológica é muitas vezes inacessível para as áreas endêmicas da doença. Somado a isso, o diagnóstico de infecção assintomática é dificultado pela ausência de um teste padrão ouro (Alvar et al., 2020). Ademais, os métodos disponíveis atualmente são poucos sensíveis e específicos para estes casos (Romero et al., 2009). Diante desse contexto, ganham visibilidade o campo da vacinologia, o qual se apresenta como alternativa de controle para variadas doenças tropicais negligenciadas (DTN), dentre elas a LV (Luna; Campos 2020).

Estima-se a ocorrência de 50.000 a 90.000 novos casos de LV por ano no mundo, a maioria dos quais ocorrem no Brasil, África Oriental e Índia. No entanto, apesar da ampla distribuição geográfica, cerca de 90% dos casos estão concentrados em dez países: Brasil, Etiópia, Eritreia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2021).

No que se refere ao tratamento da doença, ainda existem lacunas a serem superadas como a produção de medicamentos eficazes e com baixa toxicidade. Além disso, dados da literatura demonstram que além da toxicidade, é possível encontrar falhas devido à mecanismos de resistência do parasito (Imbert et al., 2014; Vanaerschot et al., 2014; Selvapandiyan et al., 2014; Moafi et al., 2019).

2. VACINOLOGIA E SUAS ETAPAS

Atualmente, o desenvolvimento de vacinas que sejam clinicamente protetoras para LV continua sendo um desafio global (Almeida et al., 2018).

Dentre as dificuldades no desenvolvimento de vacinas para humanos, destaca-se a ausência de um modelo experimental animal que seja capaz de refletir com precisão características clínicas da doença quando apresentada em seres humanos. Contudo, essa lacuna vem sendo resolvida com os avanços no campo da biotecnologia com as abordagens proteômicas (Das; Ali, 2012). Modelos experimentais como o hamster sírio (*Mesocricetus auratus*), por exemplo, simulam melhor quadros clínicos de leishmaniose visceral grave (hepatomegalia, esplenomegalia, imunossupressão, anemia, caquexia e morte) (Das; Ali, 2012).

Todavia, o maior desafio no desenvolvimento de vacinas para as leishmanioses está relacionado à quantidade significativa de espécies de protozoários capazes de

infectar o hospedeiro e causar uma das três formas da doença: cutânea, mucocutânea e visceral. De acordo com Luna; Campos (2020), as doenças tropicais negligenciadas (DTN) ainda recebem pouca atenção da indústria farmacêutica e os investimentos nesse campo ainda são baixos. Dessa forma, as vacinas se destacam, portanto, como alternativas de controle da doença.

De modo geral, toda e qualquer vacina antes de ser aprovada para uso na população, passará por diversas etapas de desenvolvimento que envolvem experimentação *in vitro*, testes pré-clínicos em animais e posteriormente teste com diferentes fases em seres humanos (Figura 1). Assim, após os testes químicos, físicos e biológicos do candidato vacinal (Etapa 1), inicia-se os testes em animais (Etapa 2) com a aplicação da formulação vacinal produzida. Nessa fase, um grupo de animais recebem a formulação vacinal e outro grupo o placebo (geralmente composto por solução salina). Após um mês (esse tempo varia entre candidatos vacinais), avaliam-se os animais e é realizado uma medição constatando se a vacina foi capaz de provocar a produção de anticorpos e células protetoras. Em seguida, inocula-se nesses animais o agente etiológico de interesse e, após alguns dias, avalia-se a quantidade de animais que adoeceram. Essa etapa somente pode ser realizada em animais (Lebron et al., 2005; Artaud; Kara; Launay, 2019; Pasternak, 2020).

Se o candidato vacinal oferecer bons resultados nos animais mostrando capacidade de proteção contra a doença, inicia-se os testes em humanos (Etapas 3 e 4). Os testes em humanos envolverão quatro fases:

Fase I – aplicação em um grupo pequeno de pessoas, monitoração intensa de eventos adversos graves e/ou adoecimento.

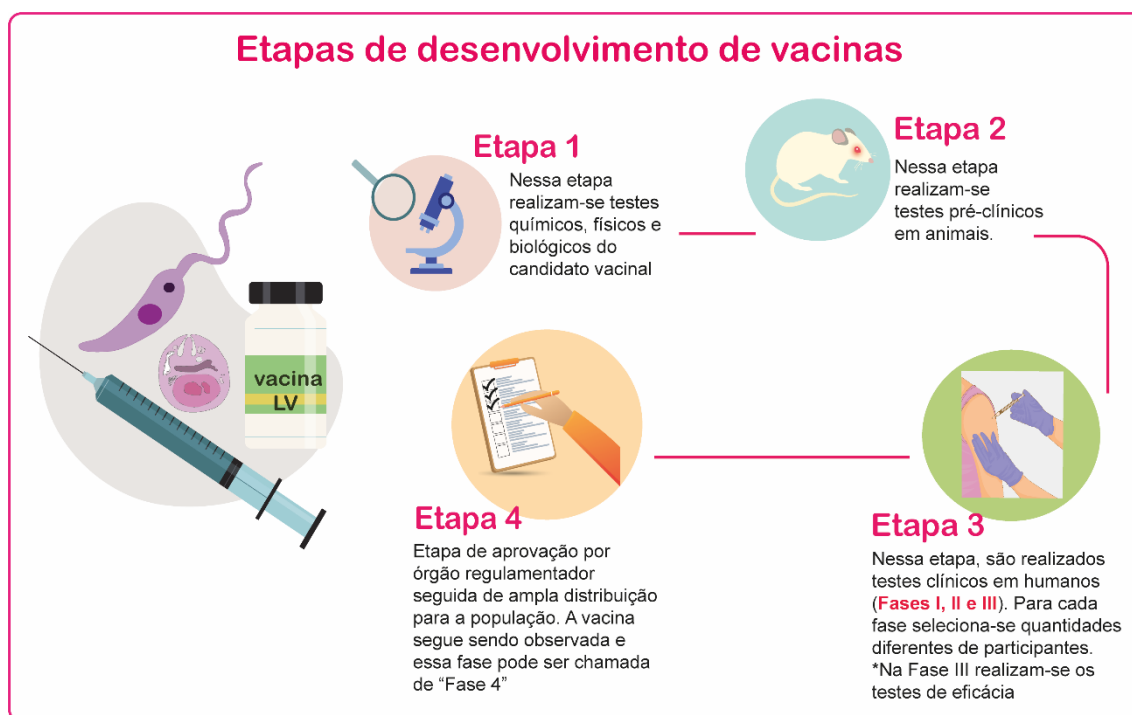
Fase II – aplicação em um grupo maior de pessoas; nessa fase é avaliado se a vacina foi capaz de provocar uma resposta imune nos indivíduos. Na obtenção de êxito após fases I e II, a vacina segue para a fase III. Somente na fase III é que são realizados os testes de eficácia.

Fase III – os voluntários são divididos em dois grupos, nos quais um grupo recebe a vacina e o outro, placebo. Os dois grupos são observados e são avaliadas as pessoas que adoeceram naturalmente. Se a vacina for bem sucedida, no grupo que recebeu placebo, poderão ocorrer mais casos da doença.

É importante levar em consideração que alguns candidatos vacinais estudarão desfechos secundários, ou seja, a capacidade de proteger contra a forma grave de determinadas doenças ou a capacidade de evitar a infecção. Além disso, fatores como produção, importação, logística de transporte e armazenamento deverão ser delineados durante a elaboração da vacina (Artaud; Kara; Launay, 2019; Pasternak, 2020).

A vacina só será utilizada na população após aprovação por órgãos reguladores. Se aprovada, ela segue sendo observada e os possíveis efeitos colaterais são relatados aos órgãos responsáveis. Essa é a fase de vigilância, ou também conhecida como Fase IV (Lebron et al., 2005; Artaud; Kara; Launay, 2019; Pasternak, 2020).

Figura 1 – Visão geral das etapas de desenvolvimento de vacinas



Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

3. CANDIDATOS VACINAIS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA

Sabe-se que a imunidade protetora da LV está associada a resposta mediada pela produção de citocinas do tipo Th1, como IFN- γ e IL-2. A citocina IL-10 está

associada a hiporresponsividade de células T, no qual sua produção é intensificada durante a LV ativa (Carvalho et al., 1985; Ghalib et al., 1993; Carvalho et al., 1994; Kumar et al., 2010).

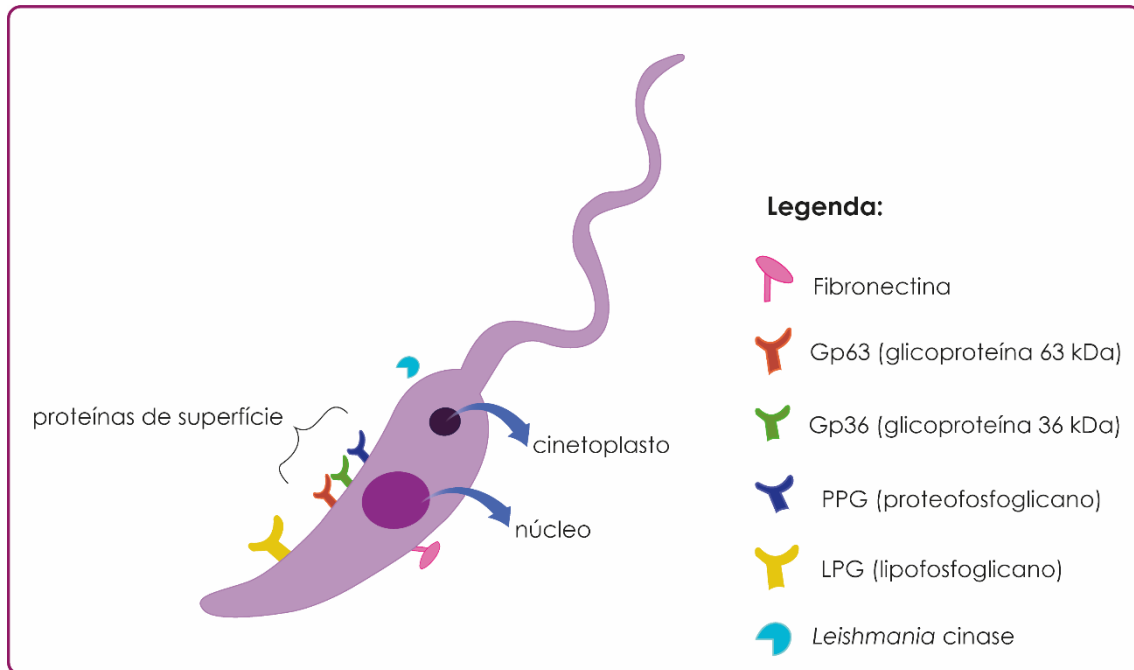
O sucesso intracelular da *Leishmania* está na capacidade desse parasito versátil evadir e modular a resposta imune do seu hospedeiro durante o estabelecimento da infecção. Esse sucesso se dá pela presença de variadas proteínas na superfície de sua membrana plasmática. O lipofosfoglicano (LPG) está presente nas formas promastigotas e possui papel fundamental no estabelecimento da infecção no vetor da LV. Essa proteína é considerada como fator de virulência de variadas espécies de *Leishmania* (Das; Ali, 2012; Sacks et al., 2001). Tem relevância a saliva dos flebótomos que atuarão como fatores de virulência devido aos seus efeitos imunomodulatórios (Gillespie et al., 2000).

De acordo com Das; Dali (2012), a *Leishmania* spp. marca seu parasitismo bem sucedido adotando mecanismos quiescentes de entrada em macrófagos, utilizando estimulação via NF- κ B (*Nuclear factor kappa B* - NF- κ B). Na fisiopatogenia da leishmaniose visceral é sabido que no tipo de resposta Th1, citocinas pró-inflamatórias como INF- γ , IL-12 e IL-2 estimulam macrófagos infectados a eliminarem parasitos internalizados (Lage et al., 2020). Em contrapartida, a resposta do tipo Th2, produz quantidades importantes de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β) que de desativam macrófagos parasitados e contribuem para o estabelecimento e desenvolvimento da doença (Dayakar et al. 2019; Lage et al., 2020; Karmakar et al., 2021). Indivíduos com a doença ativa, em grande parte, apresentam altos níveis de anticorpos do tipo IgG anti-*Leishmania* (Ghosh et al., 1995; Da Matta et al., 2000; Ryan et al., 2002). Nos indivíduos em recuperação são produzidos níveis elevados de IFN- γ e TNF- α (Rodrigues et al., 2016; Medina-Colorado et al., 2017; Arya; Arora, 2021).

Ademais, o parasito *Leishmania* expressa em sua membrana plasmática diversas proteínas que poderão atuar como candidatas vacinais. Dentre elas, merecem destaque o complexo lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína 63 (Gp63), abundantes na superfície do parasito (Figura 2). Gp63 está relacionada ao fator de virulência e patogenicidade da *Leishmania* (Paciello, 2017). De acordo com Paciello (2017), um teste realizado utilizando epítomos de Gp63 pode apresentar memória imunológica

após o primeiro contato, uma vez que essa proteína será processada no interior dos macrófagos (Machado et al., 2004; Reis et al., 2006).

Figura 2 – Proteínas de membrana da *Leishmania* spp. (representação esquemática da forma promastigota)



Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

Os melhores candidatos vacinais para LV seriam vacinas seguras e profiláticas. Além disso, espera-se que esses candidatos sejam:

- 1) Capazes de induzir a proteção duradoura para a maioria dos parasitos;
- 2) Tanto profiláticos como terapêuticos;
- 3) Realizados em número mínimo de imunizações;
- 4) De baixo custo.

Além disso, torna-se premente pensar em um sistema de entrega que não seja capaz de induzir respostas autoimunes. Outro ponto a ser levado em consideração é a apresentação de um candidato que possua mais de um antígeno, expressos nos dois estágios de vida do parasito (Nascimento et al., 2009).

As vacinas de primeira geração têm em sua composição parasitos mortos ou atenuados. As de segunda geração são elaboradas com parasitos vivos, modificados geneticamente ou que possuam genes de *Leishmania* expressos em vírus ou bactérias

ou recombinantes de proteínas de *Leishmania*. Já as vacinas mais recentes são as de terceira geração, as quais possuem genes codificadores de antígenos protetores, clonados em vetores contendo promotores eucariotos (Palatnik, 2008; Nascimento et al., 2009). Da perspectiva das vacinas em desenvolvimento tanto para uso veterinário quanto para uso humano (Moafi et al., 2019), a Tabela 1 evidencia os principais estudos em andamento, bem como a composição desses candidatos vacinais, os mecanismos de ação e fase em que o estudo se encontra.

Tabela 1 – Principais vacinas para Leishmanioses em desenvolvimento (uso veterinário e humano)

Vacina	Classificação	Composição	Fase	Mecanismo de ação	Uso	Referência do estudo
Leishvaccine	1ª geração	Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> mortos (BCG como adjuvante)	III	Ativação de células CD4+, CD8+ e células B	Veterinário	Teixeira et al., 2011
Gentamicina (<i>L. infantum</i>)	1ª geração	Forma viva de <i>L. infantum</i> atenuada por gentamicina	I	Ativação de células T e B	Veterinário	Iranian Registry of Clinical Trials, 2015
ALM + BCG	1ª geração	Antígeno total de <i>L. major</i> associado a BCG	II	Ativação de células T	Veterinário	De Luca; Macedo, 2016
Leishmune®	2ª geração	Ligante Fucose-Manose de promastigotas de <i>L. donovani</i> (Saponina como adjuvante)	III	Ativação de células T	Veterinário	Wylie et al., 2014
Canileish®	2ª geração	Extrato de proteínas excretadas de <i>L. infantum</i> (Saponina como adjuvante)	III	Indução de resposta imune Th1	Veterinário	Starita et al., 2014
Leish-Tec®	2ª geração	Proteína recombinante A2 de amastigota de <i>L. donovani</i> (Saponina como adjuvante)	III	Ativação de células T	Veterinário	Regina-Silva et al., 2016

LEISH-F1*	2ª geração	Homólogo (TSA), (LmSTI1), (LeIF) (Adjuvante MPL)	II	Ativação de células T	Humano (LC e LM)	Chakravarty et al., 2011
LEISH-F2*	2ª geração	Proteína recombinante de fusão (Adjuvante MPL)	II	-	Humano (estudo interrompido)	U.S. National Library of Medicine, 2009
LEISH-F3*	2ª geração	NH36 de <i>L. donovani</i> e esterol 24-c-metiltransferas e de <i>L. Infantum</i> (Adjuvante GLA)	I	Secreção citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-5 e IL-10	Humano (LV)	Christiaansen et al., 2017

***Não há vacina comercial para Leishmaniose humana**

BCG: Bacillus Calmette–Guérin; **TSA:** Antioxidante Thiol-específico de *L. major*; **LmSTI1:** Proteína-1 indutora de estresse de *L. major*; **LeIF:** Fator de Inibição e alongação de *L. braziliensis*; **MPL:** Monofosforil Lipídio A; **GLA:** Glicopiranosil Lipídio A; **NH36:** Nucleosídeo Hidrolase
Fonte: Adaptado de Moafi et al., 2019 “Status of Leishmania vaccines entered in clinical trials”

Entre os antígenos candidatos para vacinas de segunda geração contra LV, por exemplo, a proteína amastigota 2 (A2) é uma molécula bem estabelecida e já utilizada em vários protocolos de prevenção da leishmaniose de fase pré-clínica (Almeida et al., 2018). A A2 constitui a vacina veterinária comercialmente disponível, conhecida como Leish-Tec®. Esta por sua vez, é licenciada no mercado brasileiro desde o ano de 2008 (Testasicca et al., 2014; Regina-Silva et al., 2016; Almeida et al., 2018).

4. PERSPECTIVAS FUTURAS

Macedo Júnior et al. (2019), evidenciaram em seu estudo aspectos inerentes ao desenvolvimento de vacinas comerciais para LV, como a seleção de epítomos que sejam potencialmente capazes de impulsionar uma resposta imunogênica. Esse seria, portanto, o ponto chave para elaboração de uma vacina. O campo da bioinformática se destaca nesse contexto devido a presença de *softwares* que alinham sequências genômicas, traçando as similaridades e a partir disso fazem inferências sobre a estrutura e a função de diferentes domínios proteicos utilizando ferramentas específicas desse campo interdisciplinar.

De acordo com Macedo Júnior et al. (2019), cada proteína presente na superfície da membrana plasmática da *Leishmania* spp. é responsável por uma função singular. Por exemplo, a proteína MSP (*Major Surface Protease*) está relacionada à virulência do protozoário, já a proteína A2 confere sobrevivência em altas temperaturas no interior do hospedeiro; a proteína fator 2 é responsável pela tradução e alongação da cadeia polipeptídica no ribossomo (Macedo Junior et al.; 2019).

O entendimento da resposta imune frente à LV avança de forma precisa contribuindo expressivamente no campo biotecnológico e, apesar da limitação relacionada à diversidade de *Leishmania* spp., alguns candidatos vacinais cumpriram todos os requisitos de avaliação pré-clínica e clínica, tornando favoráveis os cenários de finalização dos ensaios e, finalmente, regulamentando-as nas agências responsáveis.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do contexto apresentado, mesmo com os inúmeros avanços no campo da vacinologia, bem como do entendimento da resposta imune frente à LV humana, não dispomos na atualidade de vacinas para nenhuma das formas da doença. Desse modo, iniciativas conjuntas estão sendo realizadas com o intuito de identificar os melhores antígenos capazes de conferir imunidade protetora contra a LV (Kumar et al., 2010). Ademais, importante ressaltar a necessidade de investimentos nos campos da Ciência e Tecnologia que permearão pesquisas futuras dentro dos espaços acadêmicos científicos. Desse modo, enaltecemos os esforços coletivos e os diversos trabalhos colaborativos, principalmente nas instituições de ensino superior públicas, que pesquisam incansavelmente novos métodos para controle e redução da incidência de diversas doenças infecciosas e parasitárias, entre as quais as doenças tropicais negligenciadas.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. P. M.; MACHADO, L. F. M.; DORO, D.; NASCIMENTO, F. C.; DAMASCENO, L.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P.; JUNQUEIRA, C. New Vaccine Formulations Containing a Modified Version of the Amastigote 2 Antigen and the Non-Virulent *Trypanosoma cruzi* CL-14 Strain Are Highly Antigenic and Protective against *Leishmania infantum* Challenge. *Front. Immunol.*, 2018.
- ALVAR, J.; ALVES, F.; BUCHETON, B.; BURROWS, L.; BÜSSCHER, P.; CARRILLO, E.; et al. Implications of asymptomatic infection for the natural history of selected parasitic tropical diseases. *Seminars in Immunopathology.* 2020 Jun.; 42: 231-246.
- ARAÚJO-PEREIRA, T. PITA-PEREIRA, D. MOREIRA, R. B.; SILVA-GALDINO, T. DUARTE, M. P. O. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis in an endemic area of Acre State in the Amazonian Region of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2018; 51(3): 376-381.
- ARTAUD C., KARA L., LAUNAY O. Vaccine Development: From Preclinical Studies to Phase 1/2 Clinical Trials. In: Arieu F., Gay F., Ménard R. (eds) *Malaria Control and Elimination. Methods in Molecular Biology*, v. 2013, 2019. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9550-9_12
- ARYA, A., ARORA, S. K. A. T-Cell Epitope-Based Multi-Epitope Vaccine Designed Using Human HLA Specific T Cell Epitopes Induces a Near-Sterile Immunity against Experimental Visceral Leishmaniasis in Hamsters. *Vaccines (Basel).* 2021 Sep 23;9(10):1058.
- BADARÓ, R.; JONES, T. C.; LOURENÇO, R.; CERF, B. J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON-Jr, W. D. A Prospective Study of Visceral Leishmaniasis in an Endemic Area of Brazil. *The Journal of Infectious Diseases.* 1986; 154(4).
- CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O.; BROWNELL, C.; REGIS, T.; COFFMAN, R. L.; REED, S. G. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol*, 1994, 152: 5949 – 5956.
- CARVALHO, E. M.; BADARÓ, R.; REED, S. G.; JONES, T.C.; JOHNSON, W. D. Jr. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J Clin Invest*, 1985, 76: 2066-2069.
- CASTELLANO, L. R. C. Resposta imune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão Anti-*Leishmania* immune response and evasion mechanisms. *VITAE Academia Biomédica Digital*, n. 25, 2005.
- CHAGAS, E.; CUNHA, A. M.; CASTRO, L. F.; DEANE, L.; DEANE, M. P.; GUIMARÃES, F. N.; SÁ, B. Leishmaniose Visceral Americana. IOC. 1937.
- CHAKRAVARTY, J.; KUMAR, S.; TRIVEDI, S.; RAI, V. K.; SINGH, A.; ASHMAN, J. A.; et al. A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis. *Vaccine* 2011; 29:3531-7.
- CHRISTIAANSEN, A. F.; DIXIT, U. G.; COLER, R. N.; BECKMANN, A. M.; REED, S. G.; WINOKUR, P. L.; et al. CD11a and CD49d enhance the detection of antigen-specific T cells following human vaccination. *Vaccine* 2017; 35:4255-61.

- DA-CRUZ A. M.; PIRMEZ, C. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: COURA, J. R. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. 2. ed. – [Reimpr.]. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. p. 746-760.
- DA MATTA, V.L.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; DIETZE, R.; CORBETT, C.E. Detection of specific antibody isotypes and subtypes before and after treatment of American visceral leishmaniasis. *J. Clin. Lab. Anal.* 2000, 14, 5–12.
- DAS, A., ALI, N. Vaccine Development Against *Leishmania donovani*. *Frontiers in Immunology*, 3. 2012.
- DAYAKAR, A.; CHANDRASEKARAN, S.; KUCHIPUDI, S. V.; KALANGI, S. K. Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. *Front. Immunol.* 2019, 10, 670.
- DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral Leishmaniasis in Brazil: Geographical distribution and transmission. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1962; 4(3): 198-212.
- DE LUCA, P. M.; Macedo, A. B. B. Cutaneous leishmaniasis vaccination: A matter of quality. *Front Immunol* 2016; 7:151.
- GHALIB, H. W., PIUVEZAM, M. R.; SKEIKY, Y. A.; SIDDIG, M.; HASHIM, F. A.; EL-HASSAN, A. M.; RUSSO, D. M.; REED, S. G. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J Clin Invest*, 1993, 92: 324-329.
- GILLESPIE, R. D., MBOW, M. L., AND TITUS, R. G. The immunomodulatory factors of blood feeding arthro-pod saliva. *Parasite Immunol.* 2000, 22, 319–331.
- GHOSH, A.K.; DASGUPTA, S.; GHOSE, A.C. Immunoglobulin G subclass-specific antileishmanial antibody responses in Indian kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1995, 2, 291–296.
- IMBERT, S.; PALOUS, M.; MEYER, I.; DANNAOUI, E.; MAZIER, D.; DATRY, A.; FEKKAR, A. In vitro combination of voriconazole and miltefosine against clinically relevant molds. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014, Nov;58(11):6996-8.
- IRANIAN REGISTRY OF CLINICAL TRIALS. 2015. Available from: <https://www.irct.ir/trial/20729>. [Last accessed on 2019 Feb 06].
- KARMAKAR, S., ISMAIL, N., OLIVEIRA, F. et al. Preclinical validation of a live attenuated dermatropic *Leishmania* vaccine against vector transmitted fatal visceral leishmaniasis. *Commun Biol* 4, 929 (2021).
- KUMAR, R.; GOTO, Y.; GIDWANI, K.; COWGILL, K. D.; SUNDAR, S.; REED, S. G. Evaluation of ex vivo human immune response against candidate antigens for a visceral leishmaniasis vaccine. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 82(5):808-813.
- LAGE, D.P.; RIBEIRO, P. A. F.; DIAS, D. S.; MENDONÇA, D. V. C.; RAMOS, F. F.; CARVALHO, L. M.; STEINER, B. T.; TAVARES, G. S. V.; MARTINS, V. T.; MACHADO, A. S.; OLIVEIRA-DA-SILVA, J. A.; SANTOS, T. T. O.; FREITAS, C. S.; OLIVEIRA, J. S.; ROATT, B. M.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; HUMBERT, M. V.; CHRISTODOULIDES, M.; COELHO, E. A. F. Liposomal Formulation of ChimeraT, a Multiple T-Cell Epitope-Containing Recombinant Protein, Is a Candidate Vaccine for Human Visceral Leishmaniasis. *Vaccines (Basel)*. 2020 Jun 9;8(2):289.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: _____. *The Leishmaniasis*. London: Academic Press, 1987; p. 1-20.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. A brief history of genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*. 1992; v. 44, p. 94-106.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Rev Pan-AmazSaude*. 2010; 1(2): 13-32.

LEBRON, J. A., WOLF, J. J., KAPLANSKI, C. V., LEDWITH, B. J. Ensuring the quality, potency and safety of vaccines during preclinical development. *Expert Review of Vaccines*, 4(6), 855–866, 2005. doi:10.1586/14760584.4.6.855

LUNA, E. J. A.; CAMPOS, S. R. S. L. C. O desenvolvimento de vacinas contra as doenças tropicais negligenciadas. *Cadernos de Saúde Pública* [online]. 2020, v. 36, n. Suppl 2 [Accessed 10 November 2021]

MACEDO JUNIOR, L. M. M.; MELO, T. F.; PECONICK, A. P. Predição in silico de epítomos antigênicos para produção de uma vacina humana contra leishmaniose visceral. *Scire Salutis*, 2019, v.9, n.1.

MACHADO, P. R. L.; CARVALHO, L. ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, E. M. Immune response mechanisms to infections. *Anais Brasileiros Dermatologia*. Rio de Janeiro. v.79, n.6, p. 647-664, 2004a.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; HERNANDEZ, C. A.; OVALLE-BRACHO, C.; SOTO, J.; VALADAS, S.; et al., *Atlas interativo de leishmaniose nas Américas: aspectos clínicos e diagnósticos diferenciais*. ©Organização Pan-Americana da Saúde, 2021.

MAROLI, M.; FELICIANGELI, M. D.; BICHAUD, L. CHARREL, R. N.; GRADONI, L. Phlebotomine sandflies and the spread in of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*. 2013; 27(2): 123-147.

MEDINA-COLORADO, A. A.; OSORIO, E. Y.; SALDARRIAGA, O. A.; TRAVI, B. L.; KONG, F.; SPRATT, H.; SOONG, L.; MELBY, P. C. Splenic CD4+ T Cells in Progressive Visceral Leishmaniasis Show a Mixed Effector-Regulatory Phenotype and Impair Macrophage Effector Function through Inhibitory Receptor Expression. *PLoS ONE* 2017, 12, e0169496.

MEIRA, J. Á.; JAMRA, M.; LIMA, M. L. M. T. Leishmaniose Visceral Americana: considerações clínicas, hematológicas e anatomopatológicas a propósito de um caso. 1948.

MOAFI, M.; REZVAN, H.; SHERKAT, R.; TALEBAN, R. *Leishmania Vaccines Entered in Clinical Trials: A Review of Literature*. *Int J Prev Med*. 2019 Jun 7; 10:95.

NASCIMENTO, I. P., ROSA, C. G.; SANTANA, Y. T. P.; SOTO, M.; BARRAL-NETTO, M. BCG NA VACINAÇÃO CONTRA LEISHMANIA. *Gaz. méd. Bahia* 2009;79 (Supl.3):122-128.

PACIELLO, M. O. Avaliação da resposta imunológica de uma formulação vacinal contra leishmaniose visceral constituída de peptídeos sintéticos da gp63 de *Leishmania major* com predição para MHC-I/MHC-II/ Mauricio Oviedo Paciello. Dissertação de Mestrado – Gurupi, TO, 2017.

PAHO: Pan American Health Organization. Available in: <<https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis/visceral-leishmaniasis>>.

PAHO. Neglected Infectious Diseases (NID). 2019 [cited 10 Nov 2021]. Available: <<https://www.paho.org/en/topics/neglected-tropical-and-vector-borne-diseases>>

PAHO: Pan American Health Organization. Available in: <<https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>>.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*. 2008; 26:1709–24.

PASTERNAK, N. Para entender o que é “eficácia” de uma vacina. Instituto Questão de Ciência. Publicado 29 dez. 2020. Disponível em: <<https://revistaquestaodeciencia.com.br/questao-de-fato/2020/12/29/para-entender-o-que-e-eficacia-de-uma-vacina>>. Acesso em: 12 nov. 2021.

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. *Bras Méd*. 1934; 18: 940-50.

PESSOA, S. B.; BARRETO, M. P. Leishmaniose tegumentar Americana. In: *Ministério da Educação e Saúde*. RJ: Imprensa Nacional, 1948; p. 527.

PRATA, A. R. Estudo Clínico e Laboratorial do Calazar. (Salvador-Bahia) Tese de concurso apresentada a Faculdade de Medicina da Bahia. 1957; p. 244.

REIS, L. C.; BRITO, M. E. F.; S. M. A.; PEREIRA, V. R. A. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. *Revista de Patologia Tropical*, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 103-115, 2006. REY, L. O complexo “Leishmania donovani” e a Leishmaniose Visceral. In.: *Parasitologia*. Parasitos e Doenças Parasitárias do homem nas Américas e na África. 3 ed., Guanabara Koogan, c. 19, 2001.

REGINA-SILVA, S.; FERES, A. M.; FRANÇA-SILVA, J. C.; DIAS, E. S.; MICHALSKY, É. M.; DE ANDRADE, H. M. et al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec[®] vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Vaccine*, 2016; 34:2233-9.

RYAN, J. R.; SMITHYMAN, A. M.; RAJASEKARIAH, G. H.; HOCHBERG, L.; STITELER, J. M.; MARTIN, S.K. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol*. 2002, 40, 1037–1043.

RODRIGUES, V.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; LAFORGE, M.; SILVESTRE, R.; ESTAQUIER, J. Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. *Parasites Vectors* 2016, 9, 1–13.

ROMERO, H, D.; SILVA, L, A, A.; SILVA-VERGARA, M, L.; RODRIGUES, V.; COSTA, R, T.; GUIMARÃES, S, F.; ALECRIM, W.; MORAES-SOUZA, H.; PRATA, A. Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81, 27–33, 2009.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *Br Med J*. 1903; 2(2237): 1261–1262. doi: [10.1136/bmj.2.2237.1261](https://doi.org/10.1136/bmj.2.2237.1261)

SACKS, D. L. Leishmania-sand fly interactions controlling species- specific vector competence. *Cell. Microbiol*. 2001, 3, 189-196.

SELVAPANDIYAN, A.; DEY, R.; GANNAVARAM, S.; SOLANKI, S.; SALOTRA, P.; NAKHASI, H. L. Generation of growth arrested *Leishmania* amastigotes: a tool to develop live attenuated vaccine candidates against visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 2014; 32:3895–901.

SHAW, J. J. New World Leishmaniasis: the ecology of Leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In: J Farrell, editors. *World Class Parasites: Leishmania*. London: *Kluwer Academic Publishers*, Boston; 2002. p. 11-31.

SILVA, L. A.; PRATA, A. Calazar. In: Coura JR. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. 2. Ed. – [Reimpr.]. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. p. 761-779.

SILVA, L. A.; ROMERO, H. D, FAGUNDES, A.; NEHME, N.; FERNANDES, O.; RODRIGUES, V.; COSTA, R. T.; PRATA, A. Use of the polymerase chain reaction for the diagnosis of asymptomatic *Leishmania* infection in a visceral leishmaniasis-endemic area. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 2013; 55(2): 101-104.

STARITA, C.; GAVAZZA, A.; LUBAS, G. Hematological, biochemical, and serological findings in healthy canine blood donors after the administration of CaniLeish[®] vaccine. *Vet Med Int*, 2016; 2016:4601893.

TEIXEIRA, M. C. A.; OLIVEIRA, G. G.; SANTOS, P. O.; BAHIENSE, T. C.; SILVA, V. M.; RODRIGUES, M. S.; et al. An experimental protocol for the establishment of dogs with long-term cellular immune reactions to *Leishmania* antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106:182-9.

TESTASICCA, M. C.; SOUZA, M, C, S.; SANOS, M, S.; MACHADO, L, M, M.; SERUFO, A, V.; DORO, D.; AVELAR, D.; IBURCIO, A, M, L.; ABRANES, C, F.; MACHADO-COELHO, G, L, L.; JR, G, G.; GAZZINELLI, R, T.; FERNANDES, A, F. Antibody responses induced by Leish-Tec[®], an A2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population. v, 204, 29, P. 169-176, 2014.

U.S. National Library of Medicine. 2009. Available from: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01011309?term=Leishmania+vac+cines>>. [Last accessed on 2019 Feb 06].

VANAERSCHOT, M.; DUMETZ, F.; ROY, S.; PONTE-SUCRE, A.; AREVALO, J.; DUJARDIN, J. C. Treatment failure in leishmaniasis: Drug-resistance or another (epi-) phenotype? *Expert Rev Anti-Infect Ther* 2014; 12:937-46.

World Health Organization (WHO). Neglected Tropical Diseases [Internet]. Geneva: WHO; 2017 [ated 2017 Apr 26]. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/global-partners-meeting/en/>.

WHO - World Health Organization. Leishmaniasis. [Internet]. WHO; 2021 [published May 20th, 2021]. Available at: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>.

WYLIE, C.; CARBONELL-ANTOÑANZAS, M.; AIASSA, E.; DHOLLANDER, S.; ZAGMUTT, F.; BRODBELT, D. et al. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally-occurring canine leishmaniosis, part I: Vaccinations. *Prev Vet Med* 2014; 117:7-18.

CAPÍTULO 10

**Vacinação Reversa: Uma Alternativa Para O
Desenvolvimento De Vacinas Contra A Leishmaniose Visceral**

Juliana Costa-Madeira¹; Maísa de Oliveira-Leandro²;
Marcela Rezende Lemes³; Rafael Destro Rosa Tiveron⁴;
Marcos Vinicius Silva⁵; Siomar de Castro Soares⁵;
Carlo José Freire Oliveira⁵

¹ *Doutoranda em Imunologia Básica e Aplicada. Programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada. Universidade de São Paulo - USP*

² *Graduanda em Biomedicina. Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM*

³ *Doutoranda em Bioinformática. Programa de pós graduação em Bioinformática - Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG*

⁴ *Mestrando em Imunologia e Parasitologia aplicadas. Programa de pós graduação em Medicina Tropical e Infectologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM*

⁵ *Professor do Departamento de microbiologia, imunologia e parasitologia. Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM*

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença negligenciada predominante em países tropicais e que acomete aproximadamente 50 a 90 mil pessoas anualmente. A doença pode ser causada por protozoários das espécies *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani* e a transmissão para os hospedeiros vertebrados ocorre por meio da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas, sendo *Phlebotomus papatasi* e *Lutzomyia longipalpis* as principais espécies vetoras. Animais domésticos e silvestres também podem ser acometidos pela doença, no qual os cães constituem o principal reservatório urbano e a *L. infantum* é a espécie responsável pela chamada Leishmaniose Visceral Canina (LVC). Apesar do esforço, ainda não há vacina disponível para uso em humanos e as opções disponíveis para cães remetem à necessidade de novas estratégias de controle da doença. A disponibilização de ferramentas de bioinformática revolucionou o desenvolvimento de vacinas. Nesse sentido, a vacinação reversa e estrutural têm sido utilizadas na identificação de novos candidatos vacinais que possam ser empregados em vacinas mais seguras e protetoras, incluindo contra a LV. Nesse capítulo, todas as pesquisas que evidenciaram a aplicação da vacinação reversa no contexto da LV foram reunidas para melhor compreensão da contribuição dessa ferramenta de bioinformática no desenvolvimento de vacinas contra a doença.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral. Flebotomíneos. Vacinação reversa. Vacinação estrutural. Bioinformática.

1. INTRODUÇÃO

A LV, também conhecida como Kala-Azar, é a doença mais grave dentre as doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania* e pode levar à morte se não houver tratamento (HERWALDT, 1999). Os órgãos mais acometidos são fígado, baço e medula óssea e a multiplicação dos parasitos ocorre em células do sistema retículoendotelial (GREVELINK; LERNER, 1996). Embora a maior parte da população seja considerada assintomática (SINGH; HASKER; SACKS; BOELAERT *et al.*, 2014), aqueles que manifestam a doença clinicamente podem apresentar perda progressiva de peso, febre, esplenomegalia, hepatomegalia, pancitopenia e hipergamaglobulinemia (VARMA; NASEEM, 2010). O principal reservatório urbano da LV causada por *L. infantum* é o cão (RIBEIRO; MICHALICK; DA SILVA; DOS SANTOS *et al.*, 2018), que pode se infectar e permanecer assintomático, o que compreende cerca de 85% dos animais infectados (FARIA; DE CASTRO VELOSO; COURA-VITAL; REIS *et al.*, 2015), ou apresentar sintomatologia similar à doença encontrada em humanos, como linfadenopatia, esplenomegalia e perda de peso (ABBEHUSEN; ALMEIDA; SOLCÀ; PEREIRA *et al.*, 2017). A doença no cão é denominada Leishmaniose Visceral Canina (LVC) e entre os sinais clínicos que a diferem da LV estão as alterações de pele e crescimento exagerado das unhas, conhecido como onicogribose. As alterações hematológicas encontradas incluem anemia normocítica, trombocitopenia, linfocitose, leucopenia e hipergamaglobulinemia. Além disso, pode haver falência hepática e renal, sendo este último quadro decorrente da deposição de imunocomplexos que causam glomerulonefrite (ABBEHUSEN; ALMEIDA; SOLCÀ; PEREIRA *et al.*, 2017; GIZZARELLI; FIORENTINO; BEN FAYALA; MONTAGNARO *et al.*, 2020; KUMAR; NYLÉN, 2012).

O desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses baseia-se, inicialmente, na observação de que indivíduos que se recuperam da infecção por *Leishmania* se tornam resistentes à reinfecção (HOHMAN; PETERS, 2019). Nesse sentido, o avanço da compreensão dos principais mecanismos que regulam a suscetibilidade/resistência à LV resultou no aumento do interesse de grupos de pesquisa em desenvolver vacinas eficazes contra a doença a partir de diferentes

metodologias e plataformas de vacinação. Apesar do esforço, ainda não há vacinas disponíveis para uso humano e isso se deve às dificuldades encontradas quanto à antigenicidade das vacinas, diferença de resposta imune entre os hospedeiros, variabilidade entre as espécies de *Leishmania* (NAGILL; KAUR, 2011) e à escolha do modelo experimental para realização dos ensaios pré-clínicos (PETITDIDIER; PAGNIEZ; PISSARRA; HOLZMULLER *et al.*, 2019; SRIVASTAVA; SHANKAR; MISHRA; SINGH, 2016).

O surgimento e disponibilização de novas plataformas de sequenciamento genômico permitiram avanços na identificação de moléculas com propriedades antigênicas. Dentre os avanços, a utilização de ferramentas de bioinformática para a predição de proteínas que possam ser potenciais candidatos vacinais a partir de dados genômicos, método conhecido como vacinação reversa, têm sido foco de diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo. No contexto da leishmaniose visceral (LV), pesquisas que aplicam a vacinação reversa e estrutural são relativamente recentes. Nestes estudos, foram realizados o *screening* de antígenos do parasito a partir de dados de genoma, proteoma e/ou transcriptomas ou transcriptomas e/ou proteoma de glândula salivar de flebotomíneos, no qual diferentes critérios de seleção de antígenos foram utilizados. De fato, esses estudos mostram que tanto os antígenos da *Leishmania* quanto os antígenos salivares do inseto vetor são capazes de gerar resposta imune protetora contra o parasito.

Nessa revisão, serão apresentados os principais dados obtidos a partir da aplicação da vacinação reversa no contexto da leishmaniose visceral, além das perspectivas em relação à contribuição de ferramentas de bioinformática no desenvolvimento de vacinas contra a doença, sejam estas oriundas de antígenos vacinais da *Leishmania*, ou seja, ela obtida de antígenos salivares dos insetos vetores.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral (LV, também conhecida como kala-azar) é considerada a forma mais grave dentre as doenças causadas por parasitos do gênero

Leishmania. É caracterizada pelo tropismo dos parasitas pelo sistema fagocítico mononuclear do baço, fígado, medula óssea e tecidos linfoides (COSTA et al., 2018). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, estima-se que 50 a 90 mil novos casos de LV ocorrem anualmente no mundo (WHO, 2021). A doença é causada pelas espécies *Leishmania infantum* (presente no velho e novo mundo) e *Leishmania donovani* (presente apenas no velho mundo) e é transmitida através da picada de fêmeas de flebotomíneos, sendo *Phlebotomus papatasi* (presente no velho mundo) e *Lutzomyia longipalpis* (presente no novo mundo) as principais espécies de vetores envolvidas na transmissão (AKHOUNDI et al., 2016). A LV causada por *L. Infantum* é zoonótica, sendo transmitida entre o homem e outros animais. No ambiente urbano, os cães são os principais reservatórios da doença (ALVAR et al., 2004).

O ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania* é digenético, com alternância entre a forma amastigota (presente nos hospedeiros mamíferos) e a forma promastigota (presente nos flebotomíneos) (SUNTER; GULL, 2017). A inoculação das formas promastigotas do parasita pelos flebotomíneos inicia a interação parasito-hospedeiro (DOS SANTOS MEIRA; GEDAMU, 2019). As células dominantes em um primeiro momento no local da infecção são os neutrófilos, sendo seguidos de outras células fagocíticas como macrófagos e células dendríticas. A resposta inata inicial tem por objetivo a destruição dos parasitas, além de contribuir para o direcionamento da resposta imune adaptativa (GOLLOB; VIANA; DUTRA, 2014).

2.2. Resposta Imune Contra a LV

Grande parte do conhecimento atual sobre a resposta imune contra a LV foi obtida através de estudos experimentais em modelos murinos (FALEIRO et al., 2014). Embora sejam observadas diferenças no grau de suscetibilidade e resistência entre as diferentes linhagens de camundongos, nesses animais a resposta imune protetora na LV está relacionada ao desenvolvimento do perfil de resposta Th1, onde as células T CD4+ são produtoras de IFN- γ . O direcionamento para Th1 é mediado pela produção de IL-12 por células apresentadoras de antígenos no início do processo infeccioso (DAYAKAR et al., 2019; RODRIGUES et al., 2016). O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória capaz de ativar os macrófagos em um perfil mais inflamatório (M1), onde mecanismos microbicidas são ativados, e dentre eles, a

produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, capazes de destruir parasitas intracelulares obrigatórios (RODRIGUES et al., 2016). As células Th17 também estão relacionadas ao perfil de resistência, principalmente através da secreção de IL-17, uma citocina que contribui para o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017). A resposta protetora também está relacionada à regulação da resposta inflamatória por meio da produção da citocina anti-inflamatória IL-10, prevenindo danos teciduais decorrentes de um processo inflamatório exacerbado (SACRAMENTO et al., 2020; SELVAPANDIYAN et al., 2012)

Por outro lado, a suscetibilidade à LV em modelos murinos está relacionada ao direcionamento do perfil de resposta Th2, com grande produção de IL-4. A resposta é também caracterizada pela presença de células T reguladoras (Tregs) e pela produção abundante de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , que tem grande efeito supressor nas células Th1 e Th17. Essa resposta resulta na polarização dos macrófagos em um perfil mais anti-inflamatório (M2), com diminuição da sua atividade antiparasitária e conseqüentemente favorecimento da sobrevivência das leishmanias e estabelecimento da infecção (DAYAKAR et al., 2019; RODRIGUES et al., 2016).

Como humanos e cães possuem grande heterogeneidade genética da população, o paradigma Th1/Th2 não é observado. Em humanos, pacientes com a doença ativa apresentam altos níveis de citocinas de ambos os perfis Th1 e Th2, além da grande presença de células Treg (FALEIRO et al., 2014). Em cães, observou-se que animais sintomáticos, assim como em humanos, apresentam tanto citocinas Th1 quanto Th2. Contudo, existe uma variação do perfil de resposta imune na LVC de acordo com o órgão acometido (HOSEIN; BLAKE; SOLANO-GALLEGO, 2017).

2.3. Vacinas Contra a LV

Apesar do esforço, ainda não há vacinas disponíveis contra a LV para uso humano. Embora diversas vacinas já tenham sido avaliadas em testes pré-clínicos, apenas algumas alcançaram a fase de ensaios clínicos e até o momento nenhuma vacina obteve licença comercial. A LEISH-F3 + SLA-SE e a Leish-111f + MPL-SE

(Clinicaltrials.gov, identificadores: NCT02071758 e NCT00486382, respectivamente) são as duas únicas vacinas que se encontram em ensaio clínico.

Por outro lado, existem 3 vacinas contra a LVC que possuem licença comercial. A Canileish® (LiESAP + adjuvante QA-21) e a LetiFend® (apenas proteína Q, sem adjuvante) são atualmente comercializadas na Europa (VELEZ; GÁLLEGO, 2020). No Brasil, a LeishTec® (proteína recombinante A2 + adjuvante saponina) é a única vacina disponível. A eficácia da LeishTec foi de 71,4% e, quando avaliada em regiões de alta pressão de infecção, apresentou uma eficácia menor, de 35,7% (PALATNIK-DE-SOUSA; NICO, 2020). Diante deste cenário, o desenvolvimento e licenciamento de vacinas para uso humano e em cães ainda se fazem necessários.

Embora seja mais usada e conhecida, a metodologia convencional para o desenvolvimento de vacinas necessita do cultivo do patógeno em condições laboratoriais específicas, além de demandar um longo tempo de desenvolvimento e um alto investimento financeiro (FRANCIS, 2018). Dessa forma, novas tecnologias para a identificação de candidatos vacinais que sejam capazes de induzir a resposta imune e que sejam mais rápidas e vantajosas financeiramente se fizeram necessárias (DONATI; RAPPUOLI, 2013).

2.4. Vacinologia Reversa (VR) e Vacinologia Estrutural (VE)

A metodologia convencional de desenvolvimento de vacinas consiste nas vacinas de primeira geração, pela utilização de cepas atenuadas ou inativadas de patógenos, e de segunda geração, com a formação de uma vacina de subunidade por meio da seleção de componentes celulares imunogênicos dos patógenos (RAPPUOLI, 2001). Na vacinologia reversa, todo o proteoma de um determinado microrganismo é analisado por uma série de ferramentas *in silico* e os melhores candidatos vacinais são selecionados (SETTE; RAPPUOLI, 2010). Dentre as diversas vantagens deste método, destaca-se a redução do custo e do tempo de desenvolvimento quando comparada à metodologia convencional, sem necessidade do cultivo do patógeno (DALSASS et al., 2019). No final do século XX, avanços nas técnicas de sequenciamento revolucionaram o desenvolvimento de vacinas. A vacinologia reversa (VR) foi desenvolvida por Rappuoli et al. (2000) e utiliza

ferramentas computacionais para a identificação de potenciais candidatos vacinais. Nessa técnica, todo o proteoma de um determinado microrganismo é analisado por uma série de ferramentas de bioinformática e os melhores candidatos vacinais são selecionados (SETTE; RAPPUOLI, 2010). A VR apresenta diversas vantagens, dentre elas a redução do custo e do tempo de desenvolvimento quando comparada à metodologia convencional, além da não necessidade do cultivo do patógeno *in vitro* (DALSASS et al., 2019).

Atualmente, vacinas têm sido desenvolvidas a partir de VE, uma metodologia que permite analisar computacionalmente a estrutura dos antígenos proteicos para a seleção de epítomos de interesse (DORMITZER; GRANDI; RAPPUOLI, 2012). A junção dos principais epítomos resulta em uma proteína quimérica que pode ser utilizada no desenvolvimento de uma vacina multi-epítomo. Com isto, o custo é menor quando comparada à purificação de várias proteínas, a resposta imune tem melhor direcionamento ao alvo e as reações adversas são menores. Por serem compostas de peptídeos estrategicamente selecionados, essas vacinas são mais seguras e desenvolvidas mais facilmente (ZHANG, 2018). Alguns estudos obtiveram sucesso com essa abordagem em animais, como a vacina multi-epítomo para *Stafilococcus aureus* (HAJIGHAHRAMANI et al., 2017) e a vacina para *Helicobacter pylori* (ZHOU et al., 2009).

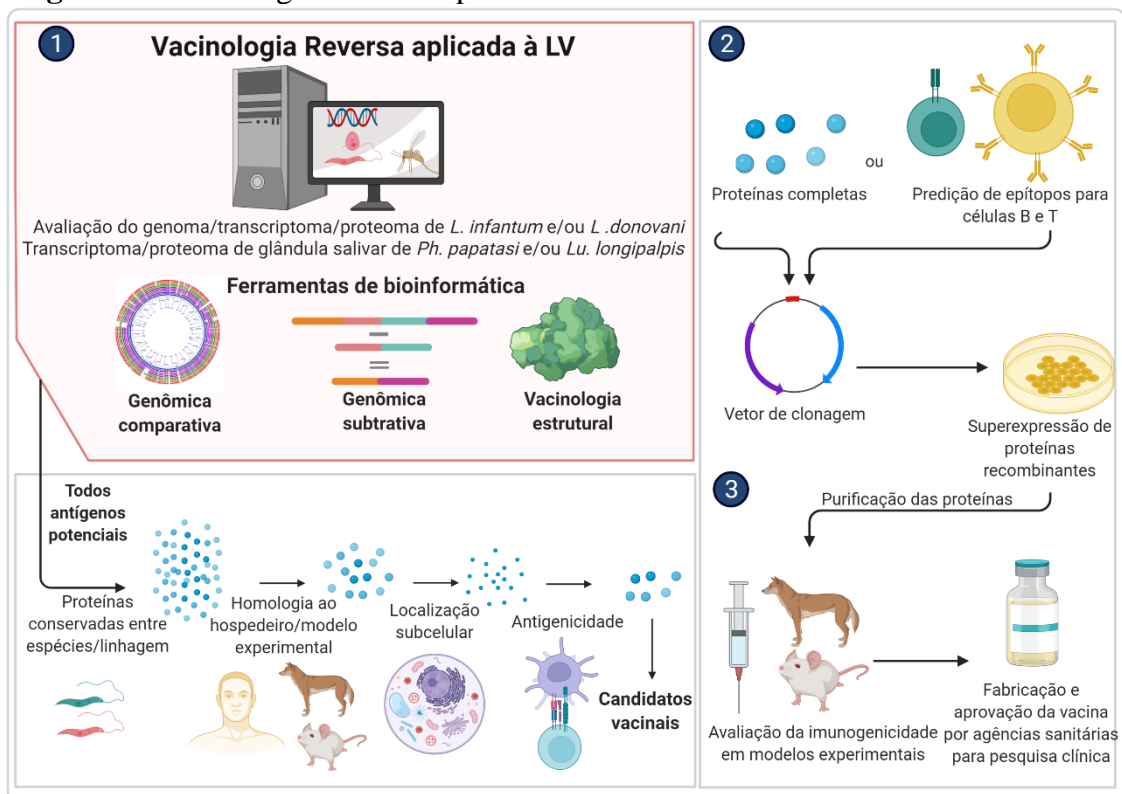
2.5. Uso De Proteínas Salivares De Flebotomíneos Em Vacinas Contra a LV

A saliva dos flebotomíneos responsáveis pela transmissão da LV contém diversas moléculas que modelam favoravelmente o microambiente no local do repasto sanguíneo e os componentes salivares do vetor são capazes de gerar uma forte imunidade celular e humoral (OLIVEIRA et al., 2006; SILVA et al., 2005). Nos últimos anos, a resposta imune induzida por componentes salivares de flebotomíneos tornaram-se foco de intensas investigações, principalmente visando a possível utilização desses componentes em vacinas contra as leishmanioses (KAMHAWI; ASLAN; VALENZUELA, 2014). Em junho de 2008, um estudo demonstrou que a imunização de hamsters com a proteína salivar LJM19 de *Lutzomyia longipalpis* gerou redução da carga parasitária e alta produção de IFN- γ e óxido nítrico no baço e fígado desses animais até 5 meses após a infecção por *L. infantum*, com proteção

contra o desfecho fatal da doença, comprovando o grande potencial de vacinas contra a LV baseadas nos vetores (GOMES et al., 2008). Acredita-se que a proteção é decorrente da produção de IFN- γ por células T CD4 no local de picada, tornando o local desfavorável para o estabelecimento da infecção (CECÍLIO; ORISTIAN; MENESES; SERAFIM *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, o uso da vacinologia reversa como estratégia de identificação de antígenos de espécies que causam a LV têm revolucionado o desenvolvimento de vacinas para a prevenção da doença. Dentre os principais critérios estão a conservação das sequências entre espécie e/ou linhagens, homologia ao hospedeiro alvo e modelo experimental, localização subcelular das proteínas, antigenicidade, abundância relativa da proteína e estágio de desenvolvimento que a proteína é expressa pelo parasito. Os principais passos seguidos por estes estudos e necessários para o desenvolvimento da vacina estão sumarizados na figura 1.

Figura 1. Vacinologia Reversa aplicada à LV.



Principais passos realizados por trabalhos que aplicam a VR no contexto da LV e necessários para o desenvolvimento de vacina contra a doença.

Figura criada com BioRender.com. Número de Chave: VS2 38 P5 2 SR **Fonte:** Autoria própria.

3. VACINOLOGIA REVERSA E ANÁLISES *IN VITRO* E *IN VIVO* NA BUSCA POR ALVOS VACINAIS CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL

O primeiro estudo a utilizar VR para LV foi conduzido por DebRoy et al. (2010). Neste estudo, a partir de anotação do genoma de *L. infantum*, foram preditas as proteínas, posteriormente classificadas como secretadas ou excretadas, análise da presença de peptídeo sinal e ausência de âncoras de membrana e domínios transmembrana. Dentre as 181 proteínas, 6 foram analisadas e validadas quanto à expressão *in vitro*, sendo liberadas em diferentes estágios do parasito (DEBROY; KEENAN; UENO; JERONIMO *et al.*, 2010). A partir daí, distintas metodologias foram aplicadas, diferindo entre elas em relação aos algoritmos utilizados para cada etapa da VR. Nesse sentido, foram identificadas 526 proteínas com potencial imunogênico conservadas entre as espécies *L. infantum* e *L. major*, preditas como localizadas na membrana ou extracelulares, apresentando no máximo 1 hélice transmembrana e que não possuíam homologia com proteínas do hospedeiro e modelo experimental (camundongo). Essas proteínas foram submetidas à predição de epítomos que se ligam ao MHC I, no qual 19 epítomos potenciais foram selecionados (JOHN; JOHN; KHOLIA, 2012). Embora algumas proteínas tenham apresentado características promissoras computacionalmente, ainda não houve uma comprovação experimental dos resultados encontrados e os autores sugerem que outras análises *in silico*, *in vitro* e *in vivo* devam ser desenvolvidas para avaliar a resposta imune diante desses epítomos.

Com o intuito de desenvolver uma vacina válida tanto para a LV quanto para a LC, Brito et al. (2017) selecionaram proteínas provenientes de seis espécies diferentes de *Leishmania*, incluindo *L. infantum* e *L. donovani* (BRITO et al., 2017). Nesse estudo, foram selecionadas 20 proteínas com potencial imunogênico já validado experimentalmente em modelo murino. Dessa forma, a escolha das proteínas não foi realizada com o auxílio da VR, mas sim analisando dados experimentais presentes na literatura. Ao considerar a importância do desenvolvimento equilibrado da resposta celular e humoral contra a *Leishmania*, foi realizada a predição de epítomos tanto para linfócitos T (analisando a capacidade de ligação à MHC de classe I e II) quanto para linfócitos B. Os epítomos foram analisados quanto à sua localização celular e passaram

por uma validação experimental. Ao analisar redes de interação proteína-proteína e vias metabólicas, concluiu-se que antígenos que apresentam uma maior proteção possuem uma quantidade maior de epítomos de linfócitos T citotóxicos (CTL) e auxiliares (HTL). Além disso, as proteínas protetoras demonstraram estarem presentes em poucas vias metabólicas do parasito. A continuação desse trabalho seria realizada em 2019, no qual foram realizadas uma série de análises experimentais (DE BRITO et al., 2019). Foram avaliados cães naturalmente infectados com *L. infantum* para encontrar *in vivo* e *in vitro* os peptídeos selecionados das análises *in silico* que mostraram ser capazes de induzir proliferação celular, produção de citocinas e hipersensibilidade tardia (DTH). Com os peptídeos que demonstraram resultados positivos em análises *in silico* e experimentais, os autores projetaram duas vacinas com os peptídeos que apresentaram os melhores e piores desempenhos, ambas com o adjuvante saponina, que foram testadas em modelo murino para avaliar proteção, imunogenicidade e indução de células T polifuncionais e de memória. A formulação vacinal com os peptídeos de melhor desempenho obteve os resultados mais promissores, com redução da carga parasitária no baço, geração de células T polifuncionais e de memória.

Apesar de novas análises experimentais ainda serem necessárias, esse estudo foi de fundamental importância ao demonstrar experimentalmente a efetividade das análises realizadas *in silico*, reforçando a promissora utilização da bioinformática nos estudos de vacina contra a LV. O primeiro estudo que utilizou ferramentas de bioinformática para desenvolvimento de uma vacina unicamente para a LV foi conduzido por Dikhit et al. (DIKHIT et al., 2017). Nesse estudo, seis proteínas super-expressas de *L. donovani* foram selecionadas para predição de epítomos para células T CD4+, importantes para o controle do parasito. Analisando o potencial de apresentação cruzada e a cobertura populacional dos epítomos preditos, seis foram selecionados para análises experimentais (os epítomos foram nomeados de P1 a P6) e analisadas quanto ao potencial de indução de IFN- γ e IL-10. Todos os 6 epítomos eram indutores de IFN- γ e apenas P3 era indutor de IL-10 e esses resultados foram confirmados *in vitro* com PBMCs de pacientes curados e pacientes tratados da LV. Além disso, os maiores níveis de anticorpos foram induzidos em PBMCs estimulados com P1, P4, P5 e P6. Para análise *in vivo* em modelo experimental, um coquetel com

todos os peptídeos foi administrado com adjuvante completo ou incompleto de Freund, resultando em um aumento na proliferação de esplenócitos e células T no baço. PBMCs de camundongos imunizados que foram desafiados com *L. donovani* produziram altos níveis de NO, IL-12, IFN- γ , IL-17 e IL-22, indicando uma resposta Th1/Th17. Houve baixos níveis na produção de IL-10 no grupo vacinado e no grupo que recebeu uma solução salina.

Em 2018, Dikhit et al., ampliando as análises já realizadas anteriormente, realizaram uma busca de epítomos imunogênicos capazes de induzir uma resposta de células T CD8+ das proteínas TSA e LeIF de *L. donovani* (DIKHIT et al., 2018), duas proteínas que já foram comprovadas anteriormente como indutoras de CD8+. No total, 9 epítomos foram selecionados, nomeados de P1 a P9. Uma análise experimental foi realizada para confirmar a importâncias dos epítomos preditos. Estimulando PBMCs de pacientes tratados de LV com um coquetel dos peptídeos, foi possível notar um aumento na produção de IFN- γ . Os resultados demonstram que o conjunto de epítomos era capaz de induzir uma resposta imune desejada e com ampla cobertura populacional.

Ao analisarem o genoma de *L. infantum* a partir de análise subtrativa do proteoma, localização subcelular, antigenicidade, presença de hélices transmembranas, alergenicidade e características físico-químicas, Vakili et al. Identificaram 16 proteínas, no qual nenhuma proteína havia sido identificada e avaliada, até aquele momento (VAKILI et al., 2018a). No mesmo ano, os autores projetaram *in silico* a primeira vacina completa contra a LV, lançando mão da VR e VE para a construção de uma vacina multi-epítomo contra *L. infantum* (VAKILI et al., 2018b). A predição de epítomos foi realizada para as proteínas histona H1, esterol 24-c-metiltransferase (SMT), proteína hipotética específica de Leishmania (LiHy) e proteína antigênica específica de Leishmania (LSAP), no qual os epítomos foram associados aos adjuvantes RpfE e RpfB. A modelagem, refinamento e validação da proteína final foram realizados para obter a estrutura 3D da vacina e a análise de *docking* molecular indicou uma ligação estável entre a vacina e o receptor TLR4. Apesar dos promissores resultados obtidos *in silico*, novos ensaios imunes *in vitro* e *in vivo* ainda precisam ser realizados para uma validação experimental.

Entre 2020 e 2021, uma grande quantidade de estudos na área foram publicados. Em 2020, Khan et al. Desenvolveram, *in silico*, uma vacina de subunidade com enfoque em proteínas das formas amastigostas de *L. donovani* (KHAN et al., 2020). As proteínas altamente secretadas no estágio de amastigota foram selecionadas e avaliadas quanto à antigenicidade. No total, 26 proteínas foram selecionadas e os epítomos foram preditos para CTL e HTL, utilizadas para a construção de uma proteína quimérica final com 9 epítomos para CTL e 14 para HTL associados ao adjuvante APPHALS, um agonista de TLR4. A proteína final foi analisada *in silico* e apresentou estabilidade, antigenicidade e não alergenicidade. O docking molecular entre a vacina e o receptor TLR4 revelou uma ligação suficientemente estável. Apesar de uma simulação *in silico* da resposta imune ter demonstrado um potencial de gerar células B de memória e um perfil Th1, análises experimentais ainda são necessárias para uma validação da vacina projetada.

Em abril de 2020, Pandey et al. selecionaram a proteína LdODC (ornitina descarboxilase) de *L. donovani* para fazer a predição de epítomos capazes de se ligar a MHC de classe II (PANDEY et al., 2020). Os 5 melhores epítomos foram selecionados e foram classificados, a partir de análise *in silico*, não indutores de IL-10. A análise do docking molecular, da cobertura populacional e da capacidade de apresentação cruzada confirmaram o potencial *in silico* dos epítomos. *In vitro*, foi demonstrado que PBMCs de pacientes tratados da LV, estimulados com os peptídeos isolados ou em conjunto, apresentam capacidade de indução de IFN- γ e nenhuma indução de IL-10, o que confirma dados *in silico*. O IFN- γ produzido era proveniente de células T CD4+ e houve ativação de macrófagos devido à produção aumentada de IL-12. Corroborando esses achados, no começo de 2021, o grupo realizou a predição de epítomos da proteína de *L. donovani* LdODC (ornitina descarboxilase) capazes de se ligarem a MHC de classe I, considerando apenas o alelo HLA-A0201 (PANDEY et al., 2021). Análises de dinâmica molecular confirmaram a estabilidade dos epítomos. Considerando a cobertura populacional e a afinidade de ligação a TAP (proteína ativadora de células T, do inglês *T-cell Activating protein*), foram selecionados os 5 principais epítomos (nomeados de P1 a P5). Ao analisar as PBMCs de pacientes tratados de LV, observou-se que células T CD8+ eram produtoras de IFN- γ e granzima B e essas células não produziram IL-10. Portanto, concluiu-se que

os epítomos preditos capazes de se ligarem a HLA-A0201 podem ativar células T CD8⁺ e exercer papel protetor. Contudo, assim como nos outros trabalhos, novas análises experimentais ainda são necessárias para analisar o potencial vacinal dos resultados obtidos.

Em maio de 2020, proteínas de *L. infantum* foram selecionadas a partir da literatura para predição de epítomos capazes de se ligarem a MHC de classe I e II, no qual duas proteínas quiméricas foram projetadas a partir dos melhores epítomos (BRITO et al., 2020). Análises de antigenicidade, alergenicidade, propriedades físico-químicas das proteínas, predição da estrutura 3D e de refinamento dos modelos foram realizadas, além da avaliação da ligação das quimeras com os TLRs 3 e 4, permitindo a seleção dos melhores modelos. Foi demonstrado que, o desafio com *L. infantum*, em modelo murino, após a administração das proteínas quiméricas associadas ao adjuvante saponina, resultou em aumento na produção de IFN- γ por células T CD4⁺ de memória central e na produção de citocinas do perfil Th1. Além disso, houve indução de proliferação de células T, aumento da produção intracelular de citocinas no baço, proliferação de células T efetoras e de memória central no baço e redução da carga parasitária. Esses achados foram importantes por mostrarem que as vacinas quiméricas construídas *in silico* são imunogênicas.

Em junho de 2020, em um estudo conduzido por Agalhou et al., epítomos foram preditos a partir de 6 proteínas de *L. infantum* que já haviam sido caracterizadas como candidatas vacinais (AGALLOU et al., 2020). Os melhores epítomos preditos que se ligam ao MHC de classe I e II foram selecionados e associados ao adjuvante HBHA para construção da proteína quimérica. As propriedades físico-químicas, alergenicidade, solubilidade e análise do docking molecular com o TLR4 da proteína revelaram que a proteína final era estável e promissora. Em modelo murino, quando a proteína quimérica foi administrada com o adjuvante Addavax, houve uma forte resposta imune, com produção de IgG1 e IgG2a, DTH e redução da carga parasitária no fígado e baço. Também houve uma grande presença de células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória central e efetoras e redução da carga parasitária após o desafio com *L. infantum*. Células T CD4⁺ e CD8⁺ efetoras demonstraram aumento da produção de NO, IFN- γ e TNF- α .

No fim de 2020, Cecílio et al. desenvolveram a primeira pesquisa vacinal baseada em proteínas da saliva dos vetores de transmissão das leishmanioses com o auxílio da VE (CECÍLIO et al., 2020). Foi realizada a predição de epítomos para MHC de classe I e II das proteínas PdSP15 e LJL143, já demonstradas na literatura como sendo potenciais candidatas vacinais contra a leishmaniose cutânea e visceral, respectivamente. Os epítomos foram fundidos e a proteína quimérica final foi analisada quanto à antigenicidade, solubilidade após super-expressão, presença de domínio transmembrana, formação de ligações dissulfeto e alergenicidade. As análises *in silico* indicaram que a proteína de fusão analisada manteve a imunogenicidade de PdSP15 e LJL143. A proteção esteve relacionada à baixa produção de IL-4 e IL-10 e conseqüentemente, à alta razão entre citocinas pró e anti-inflamatórias. No geral, esses dados sugerem que uma vacina pan-Leishmania baseada no vetor de transmissão é uma alternativa promissora.

4. CONCLUSÕES

A vacinação é uma importante ferramenta no controle de doenças infecciosas e é responsável pela diminuição da mortalidade, morbidade e erradicação de diversos microrganismos causadores de doenças em humanos, animais domésticos e silvestres. Apesar do esforço, ainda não há vacina disponível contra LV para uso humano e apenas uma vacina, que apresenta limitações, para uso em cães é licenciada no Brasil. No geral, as estratégias convencionais até então utilizadas para desenvolvimento de vacina falharam em induzir resposta imune eficaz e/ou não se mostraram seguras. O sequenciamento e disponibilização de genomas revolucionaram o desenvolvimento de vacinas por tornar possível, de maneira segura e rápida, a identificação de proteínas com potencial imunogênico, a partir de informações genômicas e proteômicas e uso de ferramentas computacionais, técnica conhecida como vacinologia reversa. Em relação à Leishmania, é sabido que tanto as proteínas do parasito como as proteínas presentes na saliva dos vetores são capazes de induzir resposta imune protetora contra a infecção. Dessa forma, a utilização de metodologias e ferramentas em bioinformática para a identificação de proteínas do parasito bem como proteínas salivares de flebotomíneos poderão contribuir para o desenvolvimento de uma vacina contra LV e LVC segura e eficaz.

REFERÊNCIAS

- AGALLOU, M. et al. A Canine-Directed Chimeric Multi-Epitope Vaccine Induced Protective Immune Responses in BALB/c Mice Infected with *Leishmania infantum*. **Vaccines**, v. 8, n. 3, p. E350, 30 jun. 2020.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, mar. 2016.
- ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1–88, 2004.
- BRITO, R. C. F. et al. Immunoinformatics Features Linked to *Leishmania* Vaccine Development: Data Integration of Experimental and In Silico Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. E371, 10 fev. 2017.
- BRITO, R. C. F. D. et al. Chimeric Vaccines Designed by Immunoinformatics-Activated Polyfunctional and Memory T Cells That Trigger Protection against Experimental Visceral Leishmaniasis. **Vaccines**, v. 8, n. 2, p. E252, 27 maio 2020.
- CECÍLIO, P. et al. Engineering a vector-based pan-*Leishmania* vaccine for humans: proof of principle. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 18653, 29 out. 2020.
- COSTA, D. N. C. C. et al. Human visceral leishmaniasis and relationship with vector and canine control measures. **Revista de Saúde Pública**, v. 52, p. 92, 14 nov. 2018.
- DALSASS, M. et al. Comparison of Open-Source Reverse Vaccinology Programs for Bacterial Vaccine Antigen Discovery. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 113, 2019.
- DAYAKAR, A. et al. Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 670, 2019.
- DE BRITO, R. C. F. et al. Synthetic Peptides Elicit Strong Cellular Immunity in Visceral Leishmaniasis Natural Reservoir and Contribute to Long-Lasting Polyfunctional T-Cells in BALB/c Mice. **Vaccines**, v. 7, n. 4, p. E162, 28 out. 2019.
- DIKHIT, M. R. et al. Identification of Potential MHC Class-II-Restricted Epitopes Derived from *Leishmania donovani* Antigens by Reverse Vaccinology and Evaluation of Their CD4+ T-Cell Responsiveness against Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1763, 2017.
- DIKHIT, M. R. et al. The potential HLA Class I-restricted epitopes derived from LeIF and TSA of *Leishmania donovani* evoke anti-leishmania CD8+ T lymphocyte response. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 14175, 21 set. 2018.
- DONATI, C.; RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology in the 21st century: improvements over the original design. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1285, p. 115–132, maio 2013.
- DORMITZER, P. R.; GRANDI, G.; RAPPUOLI, R. Structural vaccinology starts to deliver. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 10, n. 12, p. 807–813, dez. 2012.

DOS SANTOS MEIRA, C.; GEDAMU, L. Protective or Detrimental? Understanding the Role of Host Immunity in Leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. E695, 13 dez. 2019.

FALEIRO, R. J. et al. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 7, p. e2914, jul. 2014.

FRANCIS, M. J. Recent Advances in Vaccine Technologies. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 48, n. 2, p. 231–241, mar. 2018.

GOLLOB, K. J.; VIANA, A. G.; DUTRA, W. O. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 8, p. 367–376, ago. 2014.

GOMES, R. et al. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 22, p. 7845–7850, 3 jun. 2008.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. DA C. et al. The Equivocal Role of Th17 Cells and Neutrophils on Immunopathogenesis of Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1437, 2017.

HAJIGHAHRAMANI, N. et al. Immunoinformatics analysis and in silico designing of a novel multi-epitope peptide vaccine against Staphylococcus aureus. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 48, p. 83–94, mar. 2017.

HOSEIN, S.; BLAKE, D. P.; SOLANO-GALLEGO, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology**, v. 144, n. 1, p. 95–115, jan. 2017.

KAMHAWI, S.; ASLAN, H.; VALENZUELA, J. G. Vector saliva in vaccines for visceral leishmaniasis: a brief encounter of high consequence? **Frontiers in Public Health**, v. 2, p. 99, 2014.

KHAN, M. A. A. et al. An immunoinformatic approach driven by experimental proteomics: in silico design of a subunit candidate vaccine targeting secretory proteins of Leishmania donovani amastigotes. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 196, 15 abr. 2020.

Leishmaniasis. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 11 nov. 2021.

OLIVEIRA, F. et al. From transcriptome to immunome: identification of DTH inducing proteins from a Phlebotomus ariasi salivary gland cDNA library. **Vaccine**, v. 24, n. 3, p. 374–390, 16 jan. 2006.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; NICO, D. The Delay in the Licensing of Protozoal Vaccines: A Comparative History. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 204, 2020.

PANDEY, R. et al. Evaluating the immunomodulatory responses of LdODC-derived MHC Class-II restricted peptides against VL. **Parasite Immunology**, v. 42, n. 4, p. e12699, abr. 2020.

PANDEY, R. K. et al. An immunoprophylactic evaluation of Ld-ODC derived HLA-A0201 restricted peptides against visceral leishmaniasis. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, p. 1–11, 19 fev. 2021.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. **Vaccine**, v. 19, n. 17–19, p. 2688–2691, 21 mar. 2001.

RODRIGUES, V. et al. Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 118, 1 mar. 2016.

SACRAMENTO, L. A. et al. TLR4 abrogates the Th1 immune response through IRF1 and IFN- β to prevent immunopathology during *L. infantum* infection. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 3, p. e1008435, mar. 2020.

SELVAPANDIYAN, A. et al. Immunity to visceral leishmaniasis using genetically defined live-attenuated parasites. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 631460, 2012.

SETTE, A.; RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 530–541, 29 out. 2010.

SILVA, F. et al. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 1, p. 94–98, jan. 2005.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**, v. 7, n. 9, p. 170165, set. 2017.

VAKILI, B. et al. Proteome-scale identification of *Leishmania infantum* for novel vaccine candidates: A hierarchical subtractive approach. **Computational Biology and Chemistry**, v. 72, p. 16–25, fev. 2018a.

VAKILI, B. et al. Immunoinformatics-aided design of a potential multi-epitope peptide vaccine against *Leishmania infantum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, n. Pt A, p. 1127–1139, dez. 2018b.

VELEZ, R.; GÁLLEGO, M. Commercially approved vaccines for canine leishmaniasis: a review of available data on their safety and efficacy. **Tropical medicine & international health: TM & IH**, v. 25, n. 5, p. 540–557, maio 2020.

ZHANG, L. Multi-epitope vaccines: a promising strategy against tumors and viral infections. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 15, n. 2, p. 182–184, fev. 2018.

ZHOU, W.-Y. et al. Therapeutic efficacy of a multi-epitope vaccine against *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice model. **Vaccine**, v. 27, n. 36, p. 5013–5019, 6 ago. 2009.

CAPÍTULO 11

Eficácia Das Vacinas Frente As Variantes De Preocupação Da Covid-19

Eullália Gonçalo das Neves e Silva¹; Talita Nunes Cardoso²;
Wedja Marcelino da Silva³; Anna Victória Bernardes e Borges⁴;
Marcos Vinícius da Silva⁵; Lúcio Roberto Cançado Castellano⁶

¹ Mestrando em Fármacos e Medicamentos. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UEPB

² Mestrando em Fármacos e Medicamentos. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UEPB

³ Mestrando em Fármacos e Medicamentos. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UEPB

⁴ Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia –UFMT

⁵ Professor do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Universidade Federal do Triângulo Mineiro –UFMT

⁶ Professor Efetivo da Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Membro do Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (UEPB).

RESUMO

Coronavírus é um vírus zoonótico, pertencente a ordem Nidovirales e a família Coronaviridae. São capazes de infectar o sistema respiratório, gastrointestinal, hepático e o sistema nervoso central de seres humanos, outros mamíferos e aves. E pode ser dividida em 4 gêneros: alfa coronavírus (α -CoV), beta coronavírus (beta coronavírus, β -CoV), coronavírus (gama coronavírus, γ -CoV) e delta coronavírus (delta coronavírus, δ -CoV) Foi responsável por algumas epidemias nos anos anteriores e em dezembro de 2019, a Comissão de Saúde da província de Hurbei na China informou sobre a existência de um grupo de casos que apresentavam sintomas semelhantes a pneumonia em que foram realizados, inicialmente, testes para avaliar a presença de vírus e bactérias respiratórias comuns nesses pacientes, no entanto, testaram negativamente. Os testes foram positivos quando feitos para um novo coronavírus o qual foi denominado SARS-CoV-2. As vacinas contra este novo vírus que induzem respostas imunes protetoras são cruciais para a prevenção e mitigação da morbidade e mortalidade causadas pela infecção por SARS-CoV-2. Várias vacinas candidatas estão sendo desenvolvidas e testadas, incluindo vacinas de ácido nucléico, vacinas de vírus inativados, vacinas vivas atenuadas, vacinas de proteína ou subunidade de peptídeo e vacinas de vetor viral. De acordo com a Organização mundial da saúde, as vacinas são uma nova ferramenta crítica na batalha contra o COVID-19 e é extremamente encorajador ver tantas vacinas tendo sucesso e entrando em desenvolvimento. Ao mesmo tempo, mais de 200 vacinas candidatas adicionais estão em desenvolvimento, das quais mais de 60 estão em desenvolvimento clínico.

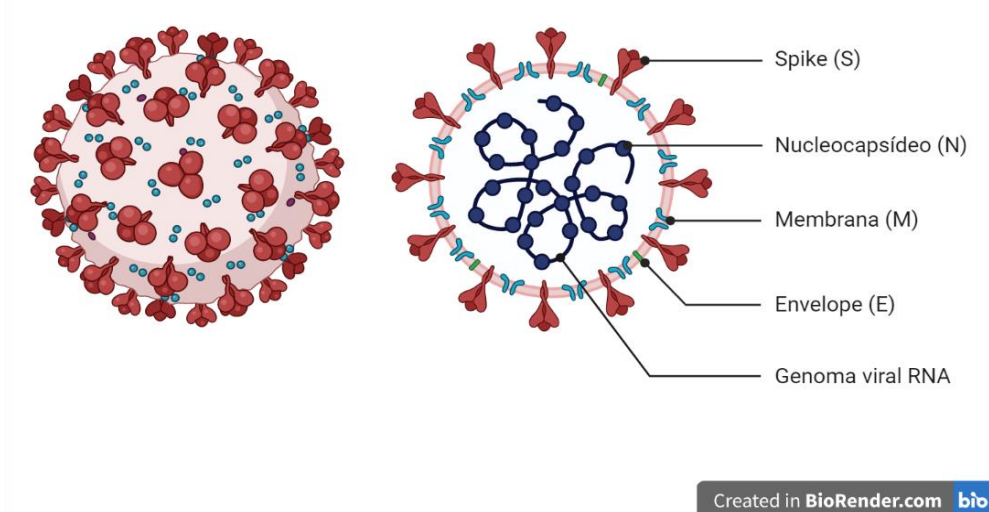
Palavras-chave: Coronavírus. Prevenção. Pandemia.

1. DESCRIÇÃO DO CORONAVÍRUS

Coronavírus é um vírus zoonótico, pertencente a ordem Nidovirales e a família Coronaviridae (LIMA, 2020). É uma família de vírus que causam infecção respiratória, ela pode ser dividida em 4 gêneros: alfa coronavírus (α -CoV), beta coronavírus (beta coronavírus, β -CoV), coronavírus (gama coronavírus, γ -CoV) e delta coronavírus (delta coronavírus, δ -CoV). Existem 7 coronavírus que são considerados como principais patógenos em humanos, são eles: coronavírus humano 229E, coronavírus humano HKU1, coronavírus humano NL63, coronavírus humano, síndrome respiratória aguda grave coronavírus (SARS-CoV), síndrome respiratória do Oriente Médio coronavírus (MERS-CoV) e SARS-CoV-2 (XIAOLEI; JINPING, 2020; LANA, 2020).

Estes vírus foram isolados em 1937 pela primeira vez. E em 1965, foram descritos como Coronavírus, em decorrência do seu formato observado na microscopia, que se assemelha a uma coroa (LIMA, 2020). São vírus pleomórficos com envelope e estão presentes neles, quatro proteínas estruturais: proteína spike (proteína S), proteína de membrana, proteína de envelope e proteína de nucleocapsídeo. Possuem uma molécula de RNA de fita positiva, com capa de 5' de fita simples (XIAOLEI; JINPING, 2020; PERLMAN; NETLAND 2009). A seguir a figura 1 representa o processo da tradução proteica das proteínas estruturais do coronavírus.

Figura 1 – Proteínas estruturais do Coronavírus. Representação esquemática do processo de tradução proteica



Fonte: Autoria própria.

Os coronavírus são capazes de infectar o sistema respiratório, gastrointestinal, hepático e o sistema nervoso central de seres humanos, outros mamíferos e aves. Em menos de duas décadas, estes vírus desencadearam pela terceira vez uma nova epidemia. Em 2002 e 2003, ocorreu a síndrome respiratória aguda grave coronavírus (SARS-CoV), que se originou na China e se expandiu afetando mais de 8.000 pessoas em 29 países. Um outro episódio ocorreu em 2012, quando surgiu na Península Arábica o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), que se espalhou principalmente no Oriente Médio, afetando mais de 2.000 pessoas. E em 2019, foi identificado na China o surgimento de um novo coronavírus, denominado SARS-CoV-2 (YAN; CHANG; WANG,2020).

2. COVID-19

Em dezembro de 2019, a Comissão de Saúde da província de Hurbei na China informou sobre a existência de um grupo de casos que apresentavam sintomas semelhantes a pneumonia. Foram realizados, inicialmente, testes para avaliar a presença de vírus e bactérias respiratórias comuns nesses pacientes, no entanto, testaram negativamente. Os testes foram positivos quando feitos para um novo coronavírus. Os chineses isolaram o vírus e sequenciaram o seu genoma (CHAN et al., 2020).

No início de janeiro de 2020, os pesquisadores chineses, que atuavam na investigação, compartilharam a sequência genética viral com a comunidade científica internacional. Esse fato, contribuiu de maneira significativa para auxiliar a produção de testes diagnósticos de biologia molecular para identificar o novo vírus. A doença infecciosa pelo coronavírus foi nomeada como, coronavírus 2, o SARS-COV-2, pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV). A doença causada pelo SARS-COV-2 passa a ser denominada pela Organização Mundial de Saúde, como COVID-19 (CHAVES; BELLEI, 2020).

A OMS, recebendo informações sobre o surto e descoberta do agente causador, respondeu rapidamente, gerando orientações sobre o monitoramento de pacientes, coletas de amostras e tratamento, além disso, coordenou a elaboração do diagnóstico, como também passou a fornecer dados informativos a respeito do problema enfrentado, ocasionado pelo vírus (MUNSTER et al., 2020).

Com o surgimento do novo vírus, a Organização Mundial de Saúde, em 30 de janeiro de 2020, declarou que, tratava-se de uma Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional (WILSON; CHEN, 2020). O isolamento de pessoas que manifestam sintomas leves e o distanciamento social foram recomendações propostas pela OMS. Em 11 de março de 2020, a OMS declarou a pandemia de Covid-19, doença causada pelo novo coronavírus (CUCINOTTA; VANELLI, 2020).

O agente etiológico da doença COVID-19, semelhantes a muitos vírus de RNA, tem evoluído para variantes. Considerando a transmissibilidade, gravidade da doença, eficácia de tratamentos reduzida, extensão da redução na neutralização por anticorpos gerados durante a infecção ou vacinação anterior, foi desenvolvido um esquema de classificação de variantes que se resumem em variantes de interesse e variantes de preocupação (KANNAN et al., 2021). As variantes Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gama (P.1) e Delta (B.1.617.2) são classificadas como variantes preocupantes (CAMPBELL et al., 2021). Recentemente, em novembro de 2021, a OMS anunciou uma nova variante de preocupação, chamada Omicron (B.1.1.529) (PETERSEN et al., 2022).

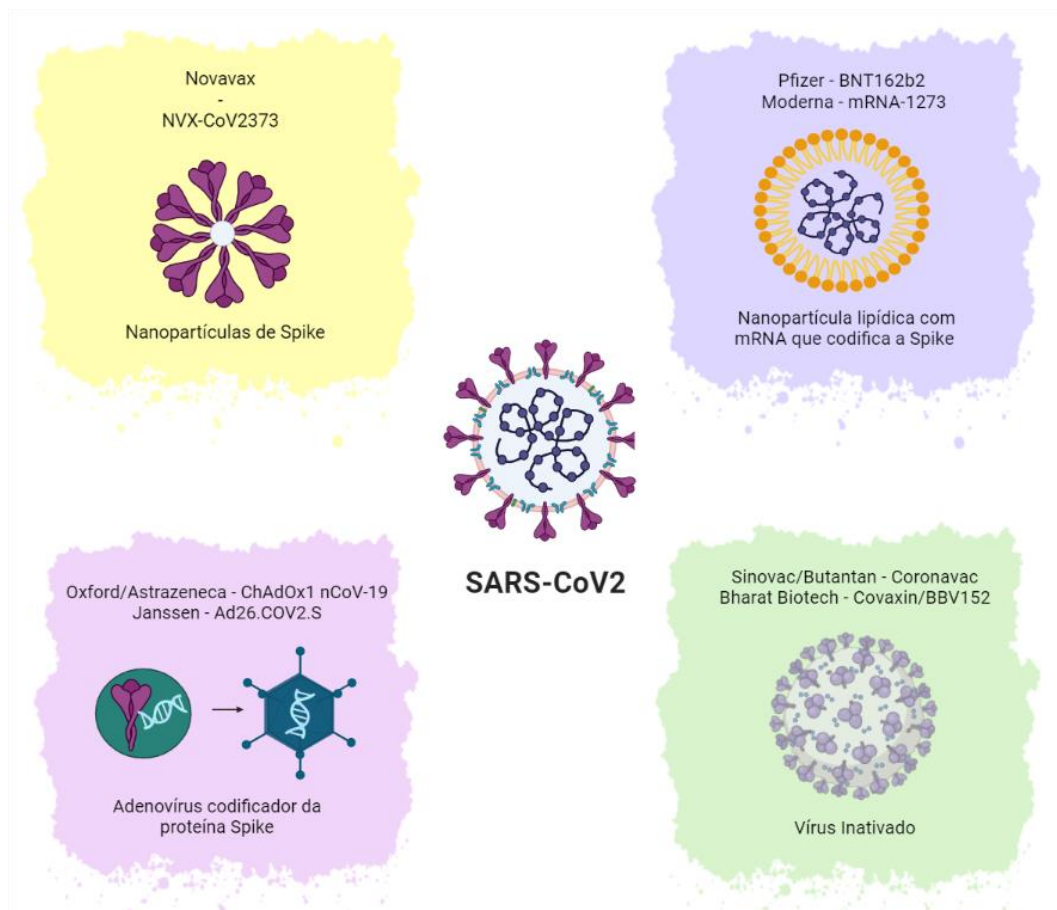
É considerada uma variante de preocupação, quando possui uma ou mais mutações que permitem infecção pelo vírus com mais facilidade ou que se dissemine entre as pessoas com mais facilidade (LAURING; MALANI, 2021). Estas, apresentam alteração das sequências de aminoácidos da proteína spike. Este fato, levantou preocupação a respeito de evasão imunológica viral e diminuição da eficácia da vacina (CHIA et al., 2021).

3. VACINAS

As vacinas contra SARS-CoV-2 que induzem respostas imunes protetoras são cruciais para a prevenção e mitigação da morbidade e mortalidade causadas pela infecção por SARS-CoV-2. Várias vacinas candidatas estão sendo desenvolvidas e testadas, incluindo vacinas de ácido nucléico, vacinas de vírus inativados, vacinas vivas atenuadas, vacinas de proteína ou subunidade de peptídeo e vacinas de vetor viral (POLAND, et al, 2020). De acordo com a Organização mundial da saúde, as vacinas são uma nova ferramenta crítica na batalha contra o COVID-19 e é extremamente encorajador ver tantas vacinas tendo sucesso e entrando em

desenvolvimento. Ao mesmo tempo, mais de 200 vacinas candidatas adicionais estão em desenvolvimento, das quais mais de 60 estão em desenvolvimento clínico. A corrida dinâmica e o direcionamento das pesquisas de cientistas de todo o mundo de forma coletiva, estão colaborando e inovando para nos trazer testes, tratamentos e vacinas, trazendo uma nova esperança para a luta contra a pandemia global (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). A figura 2 é uma representação dos principais elementos que compõem as vacinas existentes até o momento.

Figura 2 – Vacinas contra o SARS-CoV-2 Representação esquemática das vacinas existentes até o momento contra a COVID-19 e seus elementos de composição principais.



Fonte: Autoria própria.

4. VARIANTES DE PREOCUPAÇÃO (VOCS)

4.1. Variante B.1.1.7 (Alpha)

As taxas estimadas de mutação de coronavírus são moderadas a alta em comparação com as de outros vírus de RNA. Desde que seu surto começou no final

de 2019, o SARS-CoV-2 adquiriu mutações em todo o seu genoma, e já existem centenas de cepas de vírus distribuídas em todo o mundo (CHEN, et al, 2020).

O aumento das infecções por SARS-CoV-2 a níveis sem precedentes durante o final de 2020 levou ao surgimento de variantes que representam um risco maior para a saúde pública global, sendo necessária a caracterização de Variantes de Interesse (VOIs) e Variantes de Preocupação (VOCs) específicas pela OMS em parceria com redes internacionais de especialistas, autoridades nacionais, instituições e pesquisadores, para monitorização e avaliação da evolução da SARS-CoV-2 com base no risco apresentado à saúde pública global (WHO, 2021)

A primeira variante, designada B.1.1.7 e também denominada por 501Y.V1, foi identificada no Reino Unido em outubro de 2020 e posteriormente se espalhou para diversos países. Essa variante se classifica como uma variante de preocupação (VOC 202012/01), é definido por 17 mutações (14 mutações pontuais não sinônimas e 3 deleções), das quais oito estão na proteína spike, que medeia a adesão e a entrada do SARS-CoV-2 nas células humanas (DAVIES, et al., 2021)

Destas mutações, 14 codificam alterações de aminoácidos e três são deleções, incluindo seis substituições de aminoácidos na proteína S (N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A e D1118H) e duas deleções NTD (Δ H69 – V70 e Δ Y144). A linhagem foi associada a um rápido aumento da proporção de casos relatados de SARS-CoV-2, e as análises filogenéticas indicam que essa nova variante seja até 70% mais transmissível do que o vírus original, bem como apresenta uma maior carga viral (HARVEY, et al., 2021; DIMEGLIO, et al., 2021).

Muitas destas mutações ocorrem na glicoproteína S, estas incluem a posição de pico 501, um dos principais resíduos de contato no domínio de ligação ao receptor (RBD), assim, os dados experimentais sugerem que a substituição N501Y na proteína estrutural S, aumenta a ligação ao ACE2 e a infectividade celular em modelos animais, enquanto a substituição de P618H nesta proteína cria um local de clivagem de furina entre S1 e S2. A variante também possui uma deleção nas posições 69 e 70 da proteína spike (L69-70) que foi associada à falha do teste de diagnóstico para a sonda ThermoFisher TaqPath direcionada à proteína spike (RAMBAUT, et al., 2021; VOLTZ, et al., 2021; ALPERT, et al., 2021).

Foi desenvolvido por Müller, et al., (2021) um estudo para avaliar o efeito potencial que essas mutações podem ter na eficácia de anticorpos neutralizantes, a

partir da análise comparativa em plasma convalescente de 96 amostras de pacientes infectados com o SARS-COV-2 tipo selvagem, todas as amostras apresentavam um perfil sorológico consistente com infecção recente (anticorpos IgA e / ou IgG específicos para SARS-CoV-2) e foram testadas para a variante B.1.1.7, deste modo, a comparação direta dos títulos de anticorpos neutralizantes mostrou que a maioria das amostras de soro mantiveram sua capacidade de neutralizar quando testadas contra B.1.1.7, no entanto, os títulos de anticorpos contra esta variante foram mais baixos em comparação com os títulos contra o SARS-COV-2 tipo selvagem, com uma diminuição geral na atividade neutralizante de 47,7%.

Os resultados de um estudo *in vitro* realizado pela Pfizer-BioNTech, com pseudovírus SARS-CoV-2-S portadores da cepa de referência Wuhan ou da proteína de pico da linhagem B.1.1.7, avaliaram a capacidade da neutralização de anticorpos em relação à nova variante do Reino Unido, assim, foi feita a análise com soros de 16 participantes imunizados com a Pfizer-BioNTech COVID-19, e constatou-se que os títulos de anticorpos neutralizantes da linhagem B.1.1.7 foi considerado biologicamente equivalente ao pico de Wuhan SARS-COV-2 não mutado (MUIK, A. et al., 2021).

Shen, et al., (2021) desenvolveram um estudo para avaliar o fenótipo de neutralização da variante B.1.1.7 usando soros convalescentes, anticorpos monoclonais e amostras de soro de ensaios de fase 1 de uma vacina baseada em mRNA (mRNA-1273, Moderna) e uma vacina de nanopartículas de proteína (NVX-CoV2373, Novavax), deste modo, a variante B.1.1.7 do SARS-CoV-2 foi comparada com a variante D614G, assim, verificou-se que a variante B.1.1.7 foi neutralizada por todos os soros das vacinas em estudo, embora com susceptibilidade modestamente diminuída em comparação com a variante D614G.

Com base em evidências de ensaios clínicos randomizado observou-se que a vacina ChAdOx1 nCoV-19 apresenta eficácia de 70,4% (IC de 95% 43,6 a 84,5) contra COVID-19 sintomático causado pela variante B.1.1.7 e 81,5% (67,9 a 89,4) contra COVID-19 sintomático causado por variantes não B.1.1.7, os resultados dessa coorte mostram que, embora os títulos de anticorpos neutralizantes sejam mais baixos para a linhagem B.1.1.7 são suficientes para fornecer proteção, ou ainda que outros mecanismos de imunidade podem ser responsáveis pela proteção contra doenças em indivíduos vacinados (EMARY, et al., 2021).

4.2. Variante B.1.351 (Beta)

A variante B.1.351, também é conhecida como 20H / 501Y.V2, e foi identificada pela primeira vez na África do Sul em dezembro de 2020, esta variante compartilha as mutações D614G e N501Y com a variante 20I / 501Y.V1 (B.1.1.17) no domínio RBD da proteína spike, e também possui duas mutações adicionais no mesmo domínio RBD (K417N e E484K) que desempenham um papel fundamental na interação com o receptor e na evasão imunológica (CHAQROUN, et al., 2021).

Em comparação com a cepa de referência Wuhan, a variante B.1.351 tem 12 mutações não sinônimas e uma deleção. As mutações no domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína spike, são as que demandam maior preocupação, uma vez que, esta variante evoluiu para remodelar as superfícies antigênicas dos principais locais de neutralização da proteína S, resultando em uma resistência maior a alguns anticorpos neutralizantes potentes (ZHOU, et al., 2021)

A variante B.1.351 contém nove mutações na proteína de pico incluindo L18F, D80A, D215G, LAL 242-244 del, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G e A701V, enquanto os restantes estão localizados em ORF1a [K1655N], Proteína E [P71L] e proteína N [T205I]. Das nove mutações de pico, as mutações LAL 242-244 del e R246I estão localizadas no NTD, enquanto K417N, E484K e N501Y estão em RBD e A701V está localizado próximo ao local de clivagem da furina (RAMAN, et al., 2021). As mutações - K417N, E484K e N501Y - no sítio de ligação ACE2 não produzem nenhum rearranjo estrutural importante, as diferenças mais notáveis estão no NTD, que contém três mutações pontuais [L18F (Leu → Phe), D80A (Asp → Ala) e D215G (Asp → Gly)] e uma deleção de três resíduos (L242del, A243del e L244del), uma vez que, as mutações associadas ao NTD remodelam a superfície antigênica e reduzem muito a potência dos anticorpos neutralizantes contra os epítomos NTD-1 (CAI, et al., 2021).

Deste modo, a disseminação da variante B.1.351 é uma preocupação de saúde pública devido ao potencial para aumento da transmissibilidade e, por conseguinte, aumento de casos, hospitalizações e mortes. Uma vez que, essas mutações podem diminuir a imunidade desenvolvida naturalmente e ainda reduzir a eficácia das vacinas, porque muitas das mutações residem no supersítio antigênico em NTD, ou no sítio de ligação ACE2 (também conhecido como o alvo de ligação ao receptor -

RBM) que é um alvo principal de anticorpos neutralizantes potentes (WANG, et al., 202; MWENDA, et al., 2021).

As vacinas COVID-19 atuais parecem manter a atividade de neutralização intacta para B.1.1.7, no entanto, uma diminuição notável na atividade de neutralização para B.1.351 foi observada usando soro de vacinados e anticorpos monoclonais. Acredita-se que a diminuição da atividade neutralizante seja causada pela mutação E484K na glicoproteína S (HUANG, S.; WANG, S, 2021)

Segundo Bian, et al., (2021), a capacidade de neutralização dos soros imunes à vacina Pfizer / BioNTech contra a variante B.1.351 diminuiu significativamente em comparação com a variante B.1.1.7, apresentando uma redução de 7,6 vezes nos títulos de neutralização contra a variante B.1.351, enquanto o declínio foi de 3,3 vezes contra a cepa B.1.1.7. De forma semelhante, um regime de duas doses da vacina AstraZeneca-Oxford forneceu proteção mínima contra a infecção por SARS-CoV-2 leve a moderada da variante do coronavírus B.1.351, logo, pode-se concluir que a perda acentuada da capacidade de neutralização e o declínio na eficácia protetora das vacinas atuais indicam o potencial escape imunológico das variantes B.1.351.

Pesquisadores da University of Witwatersrand e outros na África do Sul e na University of Oxford, UK descobriram que a neutralização viral de soros induzida pela vacina de coronavírus ChAdOx1 nCoV-19 em um regime de duas doses, contra a variante de coronavírus B.1.351 foi substancialmente reduzida quando comparada com a cepa original de o coronavírus, deste modo fornece proteção mínima contra a infecção por COVID-19 leve a moderada da variante de coronavírus B.1.351 (OXFORD UNIVERSITY, 2021).

Em relação à eficácia das vacinas de mRNA (Pfizer e Moderna) foram autorizadas nos EUA antes da identificação dessa cepa no país, de acordo com os estudos mais recentes, essas duas vacinas produziram menos anticorpos neutralizantes do que as cepas originais. O mesmo resultado foi encontrado em relação às vacinas Novavax, Janssen e Astra-Zeneca, que conduziram testes na África do Sul que têm cepas B.1.351 mutantes dominantes, de modo que, esses estudos demonstraram a menor eficácia da vacina em comparação com as outras variantes em que essa cepa não era dominante (VASIREDDY, et al., 2021).

4.3. Variante P.1 (Gama)

Relatada pela primeira vez em 11 de janeiro de 2021 no Brasil, a variante popularmente conhecida como Gama e denominada cientificamente como P.1, GH/501Y.V2 e 20H (V2) recebeu essas designações por possuir base filogenética e genética distinta dos vírus ancestrais, ter a capacidade de se disseminar rapidamente em uma nova área além de carregar várias mutações de importância biológica (WHO, 2021; FARIA et al., 2021).

A variante Gama possui aproximadamente 35 mutações com 17 alterações de aminoácidos (incluindo 10 na proteína de pico), 3 deleções, 4 mutações sinônimas, e um par de 4 bases inserção de nucleotídeos (ABDOOL KARIM; OLIVEIRA, 2021; FARIA et al., 2021).

Em relação as ações modificadoras da variante P.1, ocorrem na proteína S (K417T, E484K e N501Y) e há evidências de que a mutação E484K pode alterar a conformação dessa proteína e afetar a resposta do anticorpo neutralizante (SANTOS et al., 2021).

De acordo com o estudo de Faria et al (2021), foi realizado uma análise filogenética para entender o surgimento da variante de preocupação P1 o qual indicou que a mesma era descendente de linhagem B.1.1.28 que foi detectada pela primeira vez no Brasil no início de março de 2020.

Algumas informações sobre a variante Gama precisam ser elucidadas, no entanto sabe-se que ela pode causar quadro graves da doença mesmo em pessoas que foram previamente infectados e por isso há uma grande preocupação em relação a efetividade da vacina (KRAUSE et al., 2021).

Em um estudo realizado por Ranzani et al. (2021) para avaliar o comportamento da CoronaVac, vacina composta por vírus inativado produzida pelo Instituto Butantan em parceria com a indústria farmacêutica sinovac, observou-se que um esquema de 2 doses da vacina teve eficácia de 41,6% (IC 95% 26,9 a 53,3) contra COVID-19 sintomático, 59,0% (IC 95% 44,2 a 69,8) contra hospitalizações associadas a COVID, e 71,4% (IC95% 53,7 a 82,3%) contra mortes associadas a COVID-19 entre aqueles com ≥ 70 anos durante uma epidemia associada à variante gama no Brasil.

4.4. Variante B.1.617.2 (Delta)

Na Índia, no final do ano de 2020, foi identificada a variante B.1.617.2 (Delta) do SARS-CoV-2, vírus que desencadeia a doença COVID-19. Posteriormente, foi detectada em aproximadamente 60 países. A taxa de transmissão desta variante se sobressai, quando comparada com as demais variantes (DOUGHERTY et al., 2021). Dados sugerem que a variante indiana possui a capacidade de se disseminar duas vezes mais rápido que o vírus SARS-CoV-2 (LAURING; MALANI, 2021). Em julho de 2021, tornou-se uma das variantes mais transmissíveis com maior número de casos relatados. Também é considerada a mais infecciosa (BARAL et al., 2021).

A variante Delta, possui várias mutações na subunidade S1, abrangendo três no domínio de ligação ao receptor (RBD) que parecem aperfeiçoar a capacidade do RBD de se ligar ao ACE2 e escapar do sistema imunológico (SCUDELLARI, 2021).

Possui mutações de pico G142D, T19R, F157del, E156G, R158del, L452R, D614G, P681R, T478K e D950N (ESSA et al., 2021). Diferente da variante Alpha, Beta e Gama, a variante Delta não apresenta mutação N501Y, assim como também, não possui a mutação de escape da vacina E484K, presente nas variantes Beta e Gama (BROWN et al., 2021).

O considerável aumento de infectados pela variante Delta, em locais, como a Índia, que indicava a superação relacionado a surtos anteriores, ou em áreas com alta cobertura de vacinas eficazes, como Israel, aponta que as vacinas produzidas para infecções anteriores pelo SARS-CoV-2, pode não ser tão eficaz contra a variante Delta (BARAL et al., 2021).

Estudo mostra que apenas uma dose da vacina Pfizer ou AstraZenica, induziu um nível quase imperceptível de anticorpos neutralizantes contra a variante Delta, em pacientes não infectados anteriormente. Todavia, observou-se altos níveis de soro-neutralização contra variantes Alpha, Beta e inclusive a Delta, em indivíduos que receberam as duas doses (PLANTAS et al. 2021).

Estudo realizado na Inglaterra, indicou que a eficácia da vacina contra a variante B.1.617.2 para duas doses de BNT162b2 (vacina de mRNA Pfizer-BioNTech) é de aproximadamente 88% e para duas doses de ChAdOx1 (vacina de vetor de adenovírus Oxford-Astrazeneca) é cerca de 60%. Comparando a eficácia das vacinas contra variante B.1.617.2 e a variante B.1.1.7, observou-se que a variante Delta

possui uma eficácia reduzida em relação a variante Alpha, em indivíduos que receberam a primeira dose destas vacinas (LOPEZ et al., 2021).

Na Índia, em estudo realizado foi descrito dados de neutralização na categoria de variante B.1.617, e propôs que amostras de soro convalescentes dos casos de COVID-19 e de receptores da vacina BBV152 (Covaxin) foram capazes de neutralizar a variante B.1.617 (YADAV et al., 2021).

Estudo recente exibiu que o Delta VOC é reduzido em 2,5 vezes em indivíduos após a segunda dose de Comirnaty, quando comparado com uma cepa SARS-CoV-2 originada em Whan, na China (LUSTIG et al., 2021).

A moderna fornece informações sobre a atividade neutralizante de sua vacina para COVID-19 em variantes emergentes, afirmando a partir de estudos de neutralização in vitro de soros de indivíduos vacinados com sua vacina, que a moderna COVID-19 produziu títulos neutralizantes contra todas as variantes testadas, incluindo a variante Delta (B.1.617.2) (COLOCAR REFERENCIA DA MODERNA).

Apesar das vacinas, autorizadas contra a doença COVID-19, ainda apresentarem proteção contra a variante Delta, também está ficando mais nítido que esta variante pode escapar do sistema imunológico ao produzir Abs neutralizantes de infecções previamente estabelecidas ou induzidas por vacinas com menor sensibilidade à ligação com proteína do pico (BARAL et al., 2021).

Estudo aponta que a variante Delta pode exibir evasão imunológica em indivíduos que receberam vacinas Pfizer BNT162b2, Moderna mRNA-1273 e Covaxin BBV152 (FARINHOLT, T. et al. 2021).

4.5. Variante B.1.1.529 (Omicron)

Relatou-se recentemente, o surgimento de uma nova variante do SARS-CoV-2 denominada omicron. Foi inicialmente identificada em Botswana (11 de novembro), e se espalhou rapidamente para países vizinhos (KARIM; KARIM, 2021).

A Organização Mundial de Saúde designou como “Variante preocupante”. E para melhor entender aspectos desta variante, pesquisadores de todo o mundo estão a investigando, contudo levará algum tempo para obter conhecimento suficiente. Em relação a transmissão, epidemiologistas temem que mutações nesta

nova variante possam torná-la mais transmissível que as outras anteriores (MOHIUDDIN; KASAHARA, 2022).

O surgimento desta variante, gerou preocupações incluindo se esta é mais infecciosa ou mais grave comparada as outras variantes de preocupação, e também se pode contornar a proteção da vacina (KARIM; KARIM, 2021). Esta variante possui substituições de aminoácidos em posições já conhecidas por estarem envolvidas no escape imunológico como E484 (FERRÉ et al. 2021).

A eficácia potencial das vacinas atualmente autorizadas e disponíveis contra a variante Omicron, deve ser examinada, mais estudos serão necessários (MOHIUDDIN; KASAHARA, 2022). Inclusive os laboratórios farmacêuticos já estão avaliando a eficácia de suas vacinas contra a Omicron (FERRÉ et al. 2021).

Em estudo, observa-se que esta variante possui muitas mutações, sendo 46 mutações de alta prevalência, específicas para Omicron. 23 estão localizadas na proteína spike (S) e as demais estão localizadas no envelope (E), membrana (M) e o nucleocapsídeo (N). As análises estruturais sugerem que mutações presentes na variante Omicron podem afetar a ligação de anticorpos (produzidos por infecção anterior ou após vacinação contra a COVID-19) à proteína S (KANNAN et al.2022). Estas mutações podem modificar respostas de vacinas, tratamentos e transmissibilidade (PETERSEN et al., 2022).

REFERÊNCIAS

ABDOOL K., S. S.; O., T. New SARS-CoV-2 variants-clinical, public health, and vaccine implications. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 19, p. 1866-1868, 2021. DOI: 10.1056/NEJMc2100362. Acesso em: 24 agosto 2021.

ALPERT, T. et al. Early introductions and transmission of SARS-CoV-2 variant B. 1.1. 7 in the United States. **Cell**, v. 184, n. 10, p. 2595-2604. e13, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.061>. Acesso em: 24 julho 2021.

BARAL, P. et al. Alterações induzidas por mutação na interface de ligação ao receptor da variante B do SARS-CoV-2 Delta. 1.617. 2 e implicações para a evasão imunológica. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 574, p. 14-19, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.08.036>. Acesso em: 26 agosto 2021.

BIAN, L. et al. Effects of SARS-CoV-2 variants on vaccine efficacy and response strategies. **Expert review of vaccines**, p. 1-9, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1903879>. Acesso em: 26 julho 2021.

BROWN, K. A. et al. Infecção na prevalência de infecções por SARS-CoV-2 sem a mutação N501Y como um marcador de expansão rápida da linhagem Delta (B.1.617.2) em Ontário, Canadá. **medRxiv**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.06.22.21259349>. Acesso em: 28 agosto 2021.

CAI, Y. et al. Structural basis for enhanced infectivity and immune evasion of SARS-CoV-2 variants. **bioRxiv**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.04.13.439709>. Acesso em: 5 julho 2021.

CAMPBELL, F. et al. Aumento da transmissibilidade e disseminação global de variantes do SARS-CoV-2 preocupantes em junho de 2021. **Eurosurveillance**, v. 26, n. 24, p. 2100509, 2021. DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.24.2100509>. Acesso em: 14 de julho 2021.

CHAN, J. F. W. et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 514-523, 2020. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30154-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30154-9).

CHAQROUN, A.; HARTARD, C.; SCHVOERER, E.. Anti-SARS-CoV-2 Vaccines and Monoclonal Antibodies Facing Viral Variants. **Viruses**, v. 13, n. 6, p. 1171, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13061171>. Acesso em: 28 agosto 2021.

CHAVES, T. SS; BELLEI, N. SARS-CoV-2, o novo Coronavírus: uma reflexão sobre a Saúde Única (One Health) e a importância da medicina de viagem na emergência de novos patógenos. **Revista de Medicina**, v. 99, n. 1, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v99i1piv>.

CHEN, B et al. Overview of lethal human coronaviruses. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 1-16, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0190-2>. Acesso em: 27 agosto 2021

CHIA, P. Y. et al. Cinética virológica e sorológica de infecções revolucionárias da vacina da variante SARS-CoV-2 Delta: um estudo de coorte multicêntrico. **medRxiv**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.07.28.21261295>. Acesso em: 29 de agosto de 2021.

CUCINOTTA, D.; VANELLI, M. OMS declara COVID-19 uma pandemia. **Acta medica: Atenei Parmensis**, v. 91, n. 1, p. 157-160, 2020. DOI: [10.23750/abm.v91i1.9397](https://doi.org/10.23750/abm.v91i1.9397). Acesso em: 13 julho 2021.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. Origem e evolução de coronavírus patogênicos. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, p. 181–192, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-018-0118-9>. Acesso em 22 maio 2021.

DAVIES, N. G. et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1. 7 in England. **Science**, v. 372, n. 6538, 2021. DOI: [10.1126/science.abg3055](https://doi.org/10.1126/science.abg3055). Acesso em: 26 julho 2021.

DIMEGLIO, C. et al. Influence of age on the spread of SARS-CoV-2 variant B. 1.1. 7. **Journal of Clinical Virology**, 2021. DOI: [10.1016/j.jcv.2021.104872](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2021.104872). Acesso em: 2 setembro 2021.

DOUGHERTY, K. et al. SARS-CoV-2 B. 1.617. 2 (Delta) variant COVID-19 outbreak associated with a gymnastics facility—Oklahoma, April–May 2021. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 70, n. 28, p. 1004, 2021. DOI: [10.15585/mmwr.mm7028e2](https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7028e2). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8314708/>. Acesso em: 23 agosto 2021.

EMARY, K. RW et al. Efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine against SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 (B. 1.1. 7): an exploratory analysis of a randomised controlled trial.

The Lancet, v. 397, n. 10282, p. 1351-1362, 2021. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00628-0). Acesso em: 03 setembro 2021.

ESSA, R. et al. Clinical features of B. 1.617. 2 (delta) variant concern (VOC): first case in Iraq. 2021.. DOI: 10.21203 / rs.3.rs-775840 / v3. Acesso em: 25 agosto 2021.

FARIA, N. R. et al. Genomics and epidemiology of the P. 1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. **Science**, v. 372, n. 6544, p. 815-821, 2021. DOI: 10.1126 / science.abh2644. Acesso em: 03 setembro 2021.

FARINHOLT, T. et al. Transmission event of SARS-CoV-2 Delta variant reveals multiple vaccine breakthrough infections. **medRxiv**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.06.28.21258780>. Acesso em: 25 agosto 2021.

FERRÉ, V. M. et al. Omicron SARS-CoV-2 variant: What we know and what we don't. *Anaesthesia Critical Care & Pain Medicine*, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.accpm.2021.100998>. Acesso em: 17 dezembro 2021.

HARVEY, W. T. et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 7, p. 409-424, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00573-0>. Acesso em: 03 setembro 2021.

HUANG, S.; WANG, S. SARS-CoV-2 Entry Related Viral and Host Genetic Variations: Implications on COVID-19 Severity, Immune Escape, and Infectivity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 3060, Março, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22063060>. Acesso em 2021.

KANNAN, S. R. et al. Análise evolutiva das variantes Delta e Delta Plus dos vírus SARS-CoV-2. **Journal of Autoimmunity**, v. 124, p. 102715, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2021.102715>. Acesso em: 13 julho 2021.

KANNAN, S. R. et al. Omicron SARS-CoV-2 variant: Unique features and their impact on pre-existing antibodies. **Journal of Autoimmunity**, v. 126, p. 1-4, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2021.102779>. Acesso em: 17 dezembro 2021.

KARIM, S. S. A.; KARIM, Q. A. Omicron SARS-CoV-2 variant: a new chapter in the COVID-19 pandemic. **The Lancet**, v. 398, p. 2224-2225, 2021. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02758-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02758-6). Acesso em: 17 dezembro 2021.

KRAUSE, P. R. et al. SARS-CoV-2 Variants and Vaccines. **New England Journal of Medicine**, 2021. DOI: 10.1056/NEJMc2100362. Acesso em: 27 agosto 2021.

LAURING A.S.; M., P.N. Variantes de SARS-CoV-2. *JAMA*. Publicado online em 13 de agosto de 2021. doi: 10.1001 / jama.2021.14181. Acesso em: 22 agosto 2021. DOI:10.1001/jama.2021.14181.

LOPEZ, J. L. et al. Eficácia das vacinas Covid-19 contra o B. 1.617. 2 (Delta) variante. **New England Journal of Medicine**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.05.22.21257658>. Disponível em: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.05.22.21257658v1>. Acesso em: 29 de agosto 2021.

LUSTIG, Yaniv et al. Capacidade de neutralização contra Delta (B. 1.617. 2) e outras variantes de preocupação após a vacinação de Comirnaty (BNT162b2, BioNTech / Pfizer) em profissionais de saúde, Israel. **Eurosurveillance**, v. 26, n. 26, p. 1- 5, 2021. DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.26.2100557>. Acesso em: 18 agosto 2021.

MODERNA. Moderna fornece uma atualização clínica sobre a atividade neutralizante de sua vacina COVID-19 em variantes emergentes, incluindo a variante Delta identificada pela primeira vez na Índia. Disponível em: <https://investors.modernatx.com/news-releases/news-release-details/moderna-provides-clinical-update-neutralizing-activity-its-covid>. Acesso em: 29 agosto 21.

MOHIUDDIN, Md; KASAHARA, Kazuo. Investigating the aggressiveness of the COVID-19 Omicron variant and suggestions for possible treatment options. **Respiratory Medicine**, v. 191, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2021.106716>. Acesso em 17 dezembro 2021.

MUIK, A. et al. Neutralization of SARS-CoV-2 lineage B. 1.1. 7 pseudovirus by BNT162b2 vaccine-elicited human sera. **Science**, v. 371, n. 6534, p. 1152-1153, 2021.. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.01.18.426984v1>. Acesso em: 25 de Agosto de 2021.

MUNSTER, V. J. et al. Um novo coronavírus emergindo na China - questões-chave para avaliação de impacto. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 692-694, 2020. DOI: 10.1056/NEJMp2000929. Acesso em: 01 julho 2021.

MWENDA, M. et al. **Detection of B. 1.351 SARS-CoV-2 Variant Strain—Zambia**, December 2020. 2021. Disponível em: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/102801>. Acesso em: 17 outubro 2021.

MÜLLER, K. et al. Emerging SARS-CoV-2 variant B. 1.1. 7 reduces neutralisation activity of antibodies against wild-type SARS-CoV-2. **Journal of Clinical Virology**, v. 142, p. 104912, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2021.104912>. Acesso em: 17 novembro 2021.

OXFORD UNIVERSITY. ChAdOx1 nCov-19 fornece proteção mínima contra infecção COVID-19 leve a moderada da variante do coronavírus B.1.351 em jovens adultos sul- africanos. [online]. Disponível em: <https://www.research.ox.ac.uk/article/2021-02-07-chadox1-ncov-19-minimal-protection-against-mild-covid-19-from-b-1-351-variant-in-young-sa-adults>. Acesso em: 29 de agosto de 2021.

PERLMAN, S.; NETLAND, J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, 439–450 (2009). DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2147>. Acesso em 22 maio 2021.

PETERSEN, E. et al. Emergence of new SARS-CoV-2 Variant of Concern Omicron (B. 1.1. 529)-highlights Africa's research capabilities, but exposes major knowledge gaps, inequities of vaccine distribution, inadequacies in global COVID-19 response and control efforts. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 114, p. 268-272, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.11.040>. Acesso em: 17 dezembro 2021.

PLANAS, D. et al. Sensibilidade reduzida de SARS-CoV-2 variante Delta à neutralização de anticorpos. **Nature**, v. 596, p. 276–280, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03777-9>. Acesso em: 17 novembro 2021.

POLAND, G.A.; OVSYANNIKOVA, I.G.; KENNEDY, R.B. SARS-CoV-2 immunity: review and applications to phase 3 vaccine candidates. **The Lancet**, v. 396, n. 10262, p. 1595-1606, Oct., 2020. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32137-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32137-1). Acesso em: 28 julho 2021.

RAMAN, R.; PATEL. K.J.; RANJAN, K. COVID-19: Unmasking Emerging SARS-CoV-2 Variants, Vaccines and Therapeutic Strategies. **Biomoléculas**, v.11, n.7, p.993, Julho, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom11070993> . Acesso em: 17 outubro 2021.

RAMBAUT, A. et al. Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations. **Arambaut ARTIC Network**.

Disponível em: <https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563>. Acesso em: 24 de agosto de 2021.

RANZANI, O. T. et al. Effectiveness of the CoronaVac vaccine in the elderly population during a P. 1 variant-associated epidemic of COVID-19 in Brazil: A test-negative case-control study. **medRxiv**, 2021. DOI: [doi: https://doi.org/10.1136/bmj.n2015](https://doi.org/10.1136/bmj.n2015). Acesso em: 28 novembro 2021.

SANTOS, C. A. et al. SARS-CoV-2 Genomic surveillance in Northeast Brazil: timing of emergence of the Brazilian variant of concern P1. **Journal of Travel Medicine**, 2021. DOI: [10.1093/jtm/taab066](https://doi.org/10.1093/jtm/taab066). Acesso em: 17 outubro 2021.

SCUDELLARI, M. Como o coronavírus infecta as células - e por que Delta é tão perigoso. **Nature**, v. 595, n. 7869, p. 640-644, 2021. DOI: [10.1038/d41586-021-02039-y](https://doi.org/10.1038/d41586-021-02039-y). Acesso em: 18 novembro 2021.

VASIREDDY, Deepa et al. Review of COVID-19 Variants and COVID-19 Vaccine Efficacy: What the Clinician Should Know?. **Journal of Clinical Medicine Research**, v. 13, n. 6, p. 317, 2021. DOI: [10.14740/jocmr4518](https://doi.org/10.14740/jocmr4518). Acesso em: 17 outubro 2021.

VOLZ, E. et al. Transmission of SARS-CoV-2 Lineage B. 1.1. 7 in England: Insights from linking epidemiological and genetic data. **MedRxiv**, p. 2020.12. 30.20249034, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.12.30.20249034>. Acesso em: 24 novembro 2021.

WANG, P. et al. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B. 1.351 and B. 1.1. 7. **Nature**, v. 593, n. 7857, p. 130-135, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03398-2>. Acesso em: 27 agosto 2021.

WILSON, M. E.; CHEN, Lin H. Viajantes dão asas a novos coronavírus (2019-nCoV). **Journal of Travel Medicine**, v. 27, n. 2, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa015>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jtm/article/27/2/taaa015/5721275>. Acesso em: 25 julho 2021.

World Health Organization. WHO. Rastreamento de variantes SARS-CoV-2. [online] Disponível em: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>. Acesso em: 24 de Agosto de 2021.

World Health Organization. WHO. Tópicos de saúde. Vacinas para COVID-19. [online] Disponível em: [https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-\(covid-19\)-vaccines](https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-(covid-19)-vaccines). Acesso em: 28 de agosto de 2021.

YADAV, P.D. et al. Neutralização da variante sob investigação B. 1.617 com soros de vacinados contra BBV152. **bioRxiv**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.04.23.441101>. Acesso em: 28 novembro 2021.

ZHOU, Daming et al. Evidence of escape of SARS-CoV-2 variant B. 1.351 from natural and vaccine-induced sera. **Cell**, v. 184, n. 9, p. 2348-2361. e6, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.037>. Acesso em: 27 agosto 2021.

CAPÍTULO 12

Análise Da Cobertura Vacinal Do Sarampo No Estado Da Paraíba (2015-2020)

Ana Karla Maciel Soares¹
Deysiane de Oliveira Brandão²
Vivianne Marcelino de Medeiros Candeia³
Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva⁴

¹*Farmacêutica.*

²*Farmacêutica, Professora das Faculdades Nova Esperança – PB.*

³*Farmacêutica, Professora das Faculdades Nova Esperança – PB.*

⁴*Farmacêutico com pós-doutorado em Imunologia na Universidade Federal da Paraíba.*

RESUMO

O sarampo é uma doença infecciosa viral grave com alto risco de contágio. A interrupção da transmissão do vírus autóctone foi alcançada através da vacinação e vigilância realizada entre as três esferas de gestão brasileira. Entretanto, em 2018, surtos da doença iniciaram-se pelo país, dois anos após o reconhecimento da eliminação da circulação do vírus na região das Américas. Baseado na importância da vacinação no controle das doenças infecciosas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a cobertura vacinal (CV) do sarampo no estado da Paraíba entre os anos 2015 e 2020. Os dados foram obtidos através do sistema DATASUS-TABNET. De 2015 a 2019, 763.520 doses da vacina tríplice viral foram aplicadas, com maior registro em 2019. Em relação à vacina tetra viral, foram aplicadas 61.992 doses, sendo o menor registro em 2016. Em relação à CV, observou-se uma variação entre 93,67%-102,53% para D1 e 56,66%-85,10% para D2 (2015-2019). No que se refere ao ano de 2020, até agosto a CV encontrava-se bem abaixo da meta de 95% (65,12% para D1). Em conclusão, faz-se necessária uma atenção maior do poder público, profissionais de saúde e população para a importância do alcance das metas da CV não só contra o sarampo, mas para as demais vacinas que compõem o calendário de vacinação, na tentativa de barrar o retorno de doenças anteriormente eliminadas/controladas.

Palavras-chave: Epidemiologia. Vacinação. Imunização.

1. INTRODUÇÃO

O sarampo é uma doença infecciosa viral grave com alto risco de contágio. Indivíduos em condições de grandes aglomerações, crianças menores de cinco anos, gestantes, pessoas imunocomprometidas, adultos maiores de 20 anos, pessoas que apresentam desnutrição e deficiência de vitamina A correm um maior risco de óbito (BRASIL, 2019a). O sarampo é considerado como uma doença da infância em populações com circulação endêmica do vírus; ele também é caracterizado como uma doença que confere, a indivíduos que foram infectados, uma imunidade duradoura (DE VRIES; DUPREX; DE SWART, 2015).

O sarampo não tem um tratamento farmacológico específico. Medicamentos como os antibióticos só devem ser considerados em caso de possibilidade de infecções secundárias. No entanto, visando à redução da morbidade e da mortalidade dos pacientes, pode-se indicar palmitato de retinol (vitamina A), após avaliação clínica adequada por profissional de saúde. O uso de medicamentos para redução da hipertermia também é indicado (BRASIL, 2019a).

A prevenção do sarampo pode ser feita por meio da vacinação, que no Brasil pode ser obtida no setor privado, mas também no setor público através do Programa Nacional de Imunizações (PNI). A vacina tríplice viral é composta pelos vírus atenuados do sarampo, caxumba e rubéola (SCR) em uma única formulação, com esquema vacinal de duas doses (D1 e D2). No caso da vacina tetra viral, acrescenta-se à tríplice o vírus atenuado da varicela (SCRV) em uma única dose. As duas vacinas são bem toleradas e apresentam poucas reações. Em casos isolados, ocorrem efeitos contrários decorrentes de reações de hipersensibilidade a algum componente da vacina (BRASIL, 2014).

De acordo com Moraes (2017), a relação entre os casos de sarampo nas regiões da Europa e em outros países devido ao turismo influencia na reintrodução do vírus em regiões anteriormente sem ocorrências - o Brasil é um exemplo disso: recebe voos diretos de países com registros da doença. Por isso, é necessário um cuidado maior nas ações de controle, principalmente em períodos de maior fluxo da doença nas regiões da Europa.

Pessoas que precisam viajar ou fazer escala/conexão em países que solicitam algum tipo de vacina devem buscar informações sobre as exigências de cada país e

do Certificado Internacional de Vacinação ou Profilaxia (CIVP) (BRASIL, 2020a). Na tentativa de conter a migração de indivíduos contaminados para o Brasil, a ANVISA juntamente com os órgãos de saúde municipais e estaduais executa a vigilância epidemiológica dos portos, aeroportos e fronteiras (BRASIL, 2020b).

Entretanto, a entrada de pacientes contaminados vindos de outros países, contribuiu para o registro de surtos no Brasil no período de 2013 a 2015. Esses surtos foram posteriormente controlados com as ações de bloqueios em cidades com maior número de casos (BRASIL, 2020c). Outro fator que favorece novos casos de sarampo é a variação da cobertura vacinal (CV). Duas possíveis causas podem levar a uma dúvida com relação à notificação realizada no sistema de saúde: uma é o registro incorreto dos dados e a outra é uma possível falha do próprio sistema (FERREIRA *et al.*, 2019).

Em 2016, durante o 55º Conselho Diretor da Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde, o Comitê Internacional de Especialistas (CIE) concedeu à região das Américas o título de eliminação do Sarampo, Rubéola e Síndrome da Rubéola Congênita (OPAS/OMS, 2016). Contudo, em 2018, o Brasil registrou uma redução da CV, refletindo novos registros da doença em vários estados (ALMEIDA *et al.*, 2020). Ao passo que movimentos migratórios de venezuelanos para estados da região norte resultou, em 2018, na disseminação do vírus selvagem, uma vez que a Venezuela enfrentava surtos de sarampo na época (PEREIRA; BRAGA; COSTA, 2019). Até abril de 2019, o declínio da CV para a D1 e D2 persistiu em vários estados do país, com destaque para a D2 que ficou muito abaixo da meta, resultando no aumento de casos em crianças menores de 5 anos (CHAVES, 2020).

Assim, o aumento da CV e homogeneidade da SCR e SCR_V, a agilidade na realização de bloqueios vacinais em todos os casos suspeitos, reforços na vigilância epidemiológica, laboratorial e de assistência em saúde e imunização são ações indispensáveis para a recertificação da eliminação do sarampo no Brasil (SATO, 2019).

Nesse sentido, em 2019, o Ministério da Saúde propôs aos três níveis de gestão e vários setores da sociedade brasileira lutar contra a redução da CV no país com o Movimento Vacina Brasil (DOMINGUES *et al.*, 2019). Para isso, o

Ministério da Saúde disponibiliza mais de 300 milhões de doses de vacinas que contemplam o Calendário Nacional de Vacinação, distribuídas nas Unidades Básicas de Saúde (BRASIL, 2020d).

O sarampo é uma doença de notificação compulsória, devendo ser feita de forma imediata (BRASIL, 2016). A vacinação de rotina deve seguir as recomendações do PNI, de acordo com o calendário de vacinação determinado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2020e). A principal estratégia usada para barrar a transmissão da doença é o cumprimento de metas para coberturas vacinais (CV) em todo o território nacional. Para o sarampo a meta nacional deve ficar acima de 95% (DE CARVALHO, 2019).

Abaixo, é relatado o esquema vacinal do sarampo de rotina (BRASIL, 2021):

- Primeira dose de tríplice viral (SCR) aplicada aos 12 meses de vida; uma dose de tríplice (SCR) + varicela ou a tetra viral (SCRV) aplicada aos 15 meses de vida;
- Duas doses de tríplice viral, a depender da situação vacinal para adolescentes e adultos com até 29 anos de idade;
- Uma dose de tríplice viral, verificada a situação vacinal anterior, para indivíduos de 30 a 59 anos de idade.

Em 2019, até o mês de agosto, foram notificados 50 casos de sarampo na Paraíba em 17 dos 223 municípios do estado. Desse total, 11 tiveram resultados positivos e/ou indeterminados para a doença, sendo enviados ao Laboratório Fiocruz para possíveis confirmações. A faixa etária com maior número de casos suspeitos foi entre crianças menores de cinco anos (BRASIL, 2019b). Assim, baseado na importância da vacinação, no controle das doenças infecciosas e na importância da pesquisa epidemiológica, esse trabalho visa avaliar a CV do sarampo no estado da Paraíba (2015-2020), correlacionando os achados com a situação epidemiológica da região.

2. METODOLOGIA

Tratou-se de um estudo transversal, retrospectivo em forma de uma pesquisa descritiva, no qual os fatos foram registrados, analisados, classificados e interpretados sem a interferência do pesquisador. Os dados foram obtidos através do Departamento

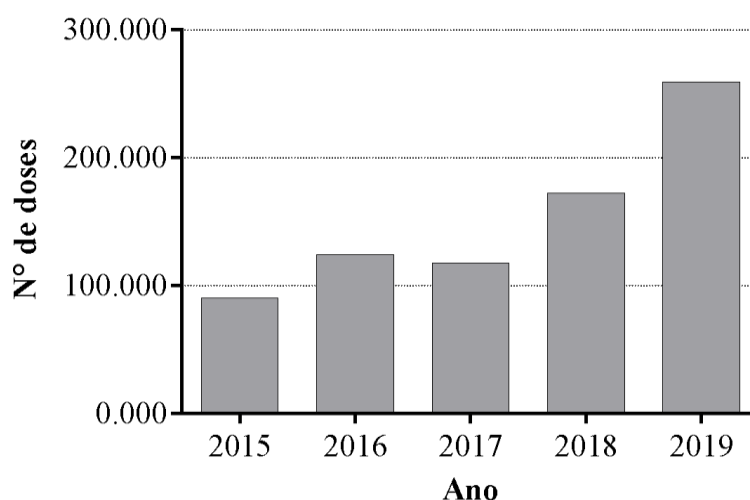
de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) (<https://datasus.saude.gov.br/acesso-a-informacao/imunizacoes-desde-1994/>), que disponibiliza dados de imunizações no seu sistema de informações TABNET.

A coleta dos dados foi realizada nos dias 20 e 24 de agosto de 2020, buscando-se os dados de cobertura vacinal do tríplice viral (D1 e D2) e tetra viral (SCR-V), Unidade da Federação: Paraíba, no período de 2015 a 2020. Foram coletados ainda os dados de número de doses aplicadas para ambas as vacinas no mesmo período, avaliando também a distribuição de doses por faixa etária. Os dados foram expressos em tabelas e gráficos, sendo esses últimos construídos através do software GraphPad Prism versão 6.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de 2015 a 2019, no estado da Paraíba, foi registrado um total de 763.520 doses aplicadas da vacina tríplice viral, com maior registro no ano de 2019 (259.397, equivalente a 33,97% do total) e menor registro em 2015 (90.319, o que corresponde a 11,83% do total). Pode-se observar entre os anos de 2015 e 2017 uma variação no número de doses aplicadas. Contudo, entre os anos de 2018 e 2019 ocorreu um aumento na aplicação dessas vacinas, conforme o Gráfico 1.

Gráfico 1 – Doses aplicadas da vacina tríplice viral por ano na Paraíba.



Fonte: SOARES, 2020 - a partir de dados do Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações (SI-PNI/CGPNI/DEIDT/SVS/MS).

Nota: N° total de vacinas aplicadas 763.520 entre 2015-2019.

A busca por uma melhor CV para o sarampo pode estar relacionada com o aumento expressivo nas doses aplicadas na Paraíba até 2019. Além disso, no mesmo ano, o Ministério da Saúde lançou o Movimento Vacina Brasil, que tinha como objetivo aumentar a CV contra o sarampo no país (DOMINGUES *et al.*, 2019). Ao analisar a região Nordeste, pode-se observar que entre os demais estados, sete seguiram a mesma crescente para o número de doses aplicadas da vacina tríplice viral, com exceção do Ceará que apresentou, em 2019, uma redução em comparação aos anos anteriores (BRASIL, 2020f).

Apesar do aumento no número de doses aplicadas da vacina tríplice viral durante esse período, ainda houve registro de novos casos de sarampo na Paraíba. Em 2019, foram confirmados, até o mês de novembro, 40 casos da doença (BRASIL, 2019c). Em suma, em 2019, a meta da CV foi atingida no estado. No entanto, é necessário que cada município atinja a meta de forma individual, para que haja uma homogeneidade da CV.

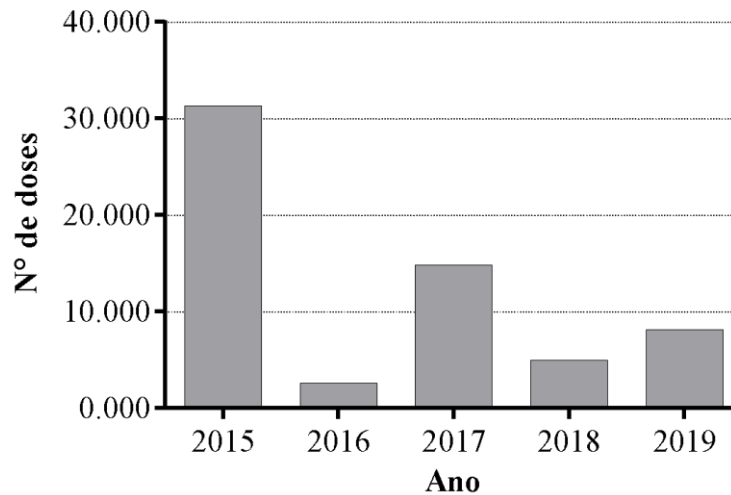
Dados obtidos em um estudo sobre o perfil epidemiológico do sarampo no Brasil entre os anos 2013 e 2018 colocaram a região Nordeste em segundo lugar no ranking do número de casos da doença, com taxas de notificações mais elevadas em 2013, 2014 e 2015 e o não registro de casos da doença em 2016 e 2017. Notou-se, então, um paralelo entre a CV e o número de casos em 2015, o que reforça a importância da homogeneidade da CV entre os municípios (COSTA *et al.*, 2020).

Ainda em 2019, até o mês de novembro foram confirmados casos da doença em 16 municípios do estado da Paraíba. As cidades com mais registros foram João Pessoa, com 15 casos, Bayeux, Campina Grande e Santa Rita, com 3 casos cada uma (BRASIL, 2019c). As CVs para estas cidades no mesmo período foram respectivamente, 97,96%, 76,97% e 100,86%. Não foram encontrados registros sobre a CV para a cidade de Santa Rita (BRASIL, 2020f).

Quanto à análise das doses aplicadas da vacina tetra viral, houve um registro total de 61.992 entre os anos de 2015 e 2019. O maior número de doses aplicadas foi em 2015 - 31.326 (50,53%); e o menor registro no ano de 2016 - 2.636 (4,25%). Em contraste ao que ocorreu com a vacina tríplice viral, a tetra viral apresentou uma queda drástica a partir de 2016 no número de doses aplicadas, permanecendo muito reduzido até 2019 (Gráfico 2). As baixas coberturas da tetra viral podem ter ocorrido devido à

ausência dessa vacina no mercado. Quando isso acontece, pode-se vacinar usando a tríplice viral mais a vacina de varicela.

Gráfico 2 – Doses aplicadas da vacina tetra viral por ano na Paraíba.



Fonte: SOARES, 2020 - a partir de dados do Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações (SI-PNI/CGPNI/DEIDT/SVS/MS).

Nota: Nº total de vacinas aplicadas 61.992 entre 2015-2019.

A vacina tetra viral corresponde à segunda dose de tríplice viral (D2) e primeira dose para o vírus varicela em uma só vacina, sendo aplicada aos 15 meses de idade (BRASIL, 2019). Em todo o Brasil, foi aplicado, entre os anos de 2015 e 2019, um total de 6.310.421 doses da vacina. Com um declínio no número de doses aplicadas, entre os anos de 2015 e 2016, indo de 2.016.396 doses para 929.695 (BRASIL, 2020f). A região Nordeste seguiu o mesmo cenário encontrado no país e na Paraíba, com uma redução no número de doses aplicadas nos anos de 2015 e 2016 para a vacina tetra viral, passando de 594.744 para 90.665 (BRASIL, 2020f).

O cumprimento da vacinação contra o sarampo seja para a D1 ou D2 é de suma importância, pois além de conferir proteção contra a doença contribui para a redução do número de casos e óbitos relacionados a ela, reduzindo os custos com tratamentos e internações hospitalares (PERSON; PUGA; ATALLAH, 2019). Uma análise realizada por Rodrigues (2020) destacou que a circulação sustentada do vírus do sarampo no Brasil se dá principalmente pela baixa CV no país, além da ameaça oriunda de casos importados da doença.

Quanto à análise da incidência por faixa etária, houve um número consideravelmente maior para a vacina tríplice viral em crianças de um ano de idade (422.170 doses), seguida pelo grupo dos adultos dos 25 aos 29 anos (53.655 doses) que receberam o imunizante. Outro dado revelado foi um maior número de doses de tetra viral aplicadas em crianças com um ano de vida (59.244 doses), seguida de crianças com dois anos de vida (1.582 doses) (Tabela 1).

Tabela 1 – Doses aplicadas por faixa etária das vacinas tríplice viral e tetra viral.

Faixa Etária	Tríplice viral	%	Tetra viral	%
< 1 ano	34.501	4,52		
1 ano	422.170	55,29	59.244	95,57
2 anos	25.738	3,37	1.582	2,55
3 anos	12.929	1,69	608	0,98
4 anos	23.705	3,10	558	0,90
5 anos	61	0,01		
6 anos	33	0,004		
9 anos	95	0,01		
10 anos	63	0,01		
11 anos	82	0,01		
12 anos	3.678	0,48		
13 anos	104	0,01		
14 anos	138	0,02		
5 a 6 anos	4.383	0,57		
7 a 11 anos	6.697	0,88		
13 a 14 anos	5.107	0,67		
15 a 16 anos	5.679	0,74		
17 a 19 anos	17.428	2,28		
20 a 24 anos	52.577	6,89		
25 a 29 aos	53.655	7,03		
30 a 34 anos	33.334	4,37		
35 a 39 anos	24.853	3,26		
40 a 44 anos	17.023	2,23		
45 a 49 anos	12.902	1,69		
50 a 59 anos	4.872	0,64		
≥ 60 anos	1.607	0,21		
Ignorado	106	0,01		
Total	763.520	100	61.992	100

Fonte: SOARES, 2020 - a partir de dados do Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações (SI-PNI/CGPNI/DEIDT/SVS/MS).

Dois fatores contribuem para o maior registro nas doses aplicadas por faixa etária: um é a determinação do Ministério da Saúde quanto ao público-alvo para cada dose da vacina contra o sarampo; o outro fator é a necessidade de manter não só ações de rotina, como também campanhas de vacinação para faixas etárias com maior número de casos da doença. Um estudo realizado por Chaves (2020) constatou que nas regiões brasileiras entre os anos de 2017 e 2019 ocorreu o ressurgimento de casos de sarampo no país, com maior número de casos entre crianças menores de cinco anos e adultos de 20 a 29 anos. Isso foi resultado da baixa CV no país. Até novembro de 2019 foram confirmados 9 casos da doença em todo o estado da Paraíba entre crianças menores de 1 ano, e 9 entre adultos dos 20 aos 29 anos (BRASIL, 2019c).

A CV corresponde à vacinação em 1 ano para as vacinas tríplice viral (D1 e D2) e tetra viral divididas pela população-alvo segundo o esquema vacinal, multiplicada por 100.

- Tríplice viral D1 (SRC): soma das doses aplicadas (D1) do esquema vacinal;
- Tríplice viral D2 (SRC): soma das doses aplicadas (D2) da vacina tríplice viral + as doses (D) da vacina tetra viral (BRASIL, 2020g).

No que se refere à análise da CV, entre os anos de 2015 e 2019 foi observado um melhor alcance na meta para a primeira dose da vacina tríplice viral; já para a segunda dose notou-se uma instabilidade crescente e insatisfatória (Tabela 2) em sua cobertura vacinal.

Tabela 2 – Coberturas vacinais de tríplice viral (D1, D2) e tetra viral.

Ano	CV tríplice viral D1	CV tríplice viral D2	CV tetra viral
2015	93,67%	64,46%	57,99%
2016	96,59%	56,66%	61,22%
2017	90,90%	67,93%	23,84%
2018	96,73%	72,18%	8,61%
2019	102,53%	85,10%	12,95%

Fonte: SOARES, 2020 - a partir de dados do Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações (SI-PNI/CGPNI/DEIDT/SVS/MS).

CV: Cobertura Vacinal.

De acordo com um estudo feito por Sato (2018), a CV no Brasil entre os anos de 1994 e 2018 apresentou um declínio a partir de 2016 correlacionado ao atraso na aceitação ou recusa por parte dos indivíduos para as vacinas disponíveis no sistema de saúde, resultando no registro de novos casos no país. Apesar do grande esforço para promover ações de vacinação de rotina em crianças com 1 ano de vida em 2018, principalmente entre os estados que tiveram casos confirmados da doença, nenhum estado atingiu a meta para a D2 (CHAVES, 2020).

Atualmente, o mundo e o Brasil vivem um momento atípico frente à disseminação da COVID-19 e, também por isso, as taxas de CVs estão em constante redução. Entre dezembro de 2019 e agosto de 2020 foram confirmados 7.856 casos de sarampo no país. Na região Nordeste, os estados de Alagoas, Ceará, Maranhão, Pernambuco e Sergipe apresentaram registro da doença (BRASIL, 2020f). Os dados preliminares da vacina tríplice viral, mostram que foram aplicadas 93.573 doses em todo o estado da Paraíba. Já a tetra viral teve um total de 1.484 doses aplicadas. A CV encontra-se até o momento com um índice bem abaixo da meta para as duas vacinas: a D1, por exemplo, alcançou apenas 65,12% de CV (Tabela 3).

Tabela 3 – Doses aplicadas e cobertura vacinal das vacinas tríplice e tetra viral de janeiro a 24 de agosto de 2020.

Ano	Total de doses tríplice viral	Total de doses tetra viral	CV Tríplice viral D1	CV Tríplice viral D2	CV Tetra viral
2020	93.573	1.484	65,12%	43,15%	4,2%

Fonte: SOARES, 2020 - a partir de dados do Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações (SI-PNI/CGPNI/DEIDT/SVS/MS).

CV: Cobertura Vacinal.

Observou-se ainda que as doses aplicadas por faixa etária entre o público-alvo para as vacinas do sarampo de janeiro a agosto de 2020 encontram-se bem reduzidas. A tetra viral representou até o momento um total de 1.381 doses aplicadas em crianças de 1 ano de idade (Tabela 4).

Tabela 4 – Doses aplicadas por faixa etária das vacinas tríplice e tetra viral de janeiro a 24 de agosto de 2020.

Faixa etária	Tríplice viral	Tetra viral
< 1 ano	9.611	
1 ano	40.664	1.381
2 anos	1.080	56
3 anos	356	13
4 anos	622	34
12 anos	925	
5 a 6 anos	717	
7 a 11 anos	3.017	
13 a 14 anos	2.289	
15 a 16 anos	3.276	
17 a 19 anos	4.465	
20 a 24 anos	6.336	
25 a 29 anos	7.596	
30 a 34 anos	3.330	
35 a 39 anos	2.840	
40 a 44 anos	2.370	
45 a 49 anos	1.911	
50 a 59 anos	1.948	
≥ 60 anos	220	
Total	93.573	1.484

Fonte: SOARES, 2020 - a partir de dados do Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações (SI-PNI/CGPNI/DEIDT/SVS/MS).

Os serviços de vacinação oferecidos em farmácias podem ampliar a acessibilidade para a população, favorecendo a CV de forma efetiva, além de fomentar a importância da imunoprevenção contra doenças virais e bacterianas. Em dezembro de 2017, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a RDC nº197, que dispõe sobre os requisitos mínimos para o serviço de vacinação em farmácias e, através desta resolução, instituiu que deve haver um profissional legalmente habilitado durante todo período em que o serviço de vacinação for disponibilizado (BRASIL, 2017).

O farmacêutico imunizador tem um importante papel na contribuição para o aumento das taxas de CV no país. Entre pessoas carentes que frequentam centros de cuidados primários, a sua colaboração demonstrou um impacto positivo na qualidade do atendimento e nas taxas de CV em pacientes adultos (HIGGINBOTHAM;

STEWART; PFALZGRAF, 2012). Desse modo, vale ressaltar a necessidade de uma melhor cooperação entre os programas de saúde pública e as farmácias, fazendo um melhor proveito do serviço de vacinação oferecido por farmacêuticos nesses estabelecimentos (FITZGERALD *et al.*, 2016).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no que foi mostrado na pesquisa, conclui-se que até 2019 o estado da Paraíba obteve um melhor alcance da CV para a primeira dose da vacina contra o sarampo e uma redução sustentada da CV na segunda dose. Os dados encontrados sobre a CV no ano de 2020 revelam uma redução preocupante não só para a segunda dose da vacina, mas também para a primeira.

A baixa CV, seja da D1 ou D2, pode trazer riscos à saúde da população e especialmente entre crianças menores de cinco anos e adultos com idade entre 20 e 29 anos, visto que estes possuem um elevado registro de contaminação da doença. Assim, faz-se necessária uma atenção maior do poder público, profissionais de saúde e população para a importância do alcance das metas da CV não só contra o sarampo, mas para as demais vacinas que compõem o calendário de vacinação, na tentativa de barrar o retorno de doenças anteriormente eliminadas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C. M. S. *et al.* Correlação entre o aumento da incidência de sarampo e a diminuição da cobertura vacinal dos últimos 10 anos no Brasil. **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v. 3, n. 1, p. 406-415, 2020.

BRASIL. Calendário Nacional de Vacinação. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/calendario-de-vacinacao>. 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Certificado Internacional de Vacinação ou Profilaxia – CIVP**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/certificado-internacional-de-vacinacao-ou-profilaxia>. Acesso em: 29 abr. 2020a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Postos de Vigilância Sanitária em Portos, Aeroportos e Fronteiras**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/postos-anvisa>. Acesso em: 21 abr. 2020b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sarampo**: Situação Epidemiológica. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/sarampo-situacao-epidemiologica>. Acesso em: 02 de mai. 2020c.

BRASIL. Ministério da saúde. **Vacinação**: quais são as vacinas, para que servem, porque vacinar, mitos. 2020. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/vacinacao/vacine-se>. Acesso em: 27 abr. 2020d.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Imunização**. 2020. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/sismob/instrutivo-e-legislacao-dos-programas/programa-nacional-de-imunizacao>. Acesso em: 27 abr. 2020e.

BRASIL. Ministério da Saúde. Banco de Dados do Sistema Único de Saúde – DATASUS/TABNET. Informações de Saúde, Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações (SI-PNI/CGPNI/DEIDT/SVS/MS), 2020f.

BRASIL. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde – DATASUS. **Nota técnica cobertura vacinal**. 2020g.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de vigilância em saúde**. Brasília; Ministério da Saúde, 3. ed., 2019a.

BRASIL. Secretaria de Estado e Saúde da Paraíba. Gerencia Executiva de Vigilância em Saúde. Gerência Operacional de Vigilância Epidemiológica. Núcleo de Doenças Transmissíveis e Aguda. Núcleo de Imunizações. **Nota Técnica n° 02**. 26 de agos. 2019b.

BRASIL. Secretaria de Estado de Saúde. Gerência Executiva de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**. Paraíba, n. 04, nov. 2019c.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada – RDC N° 197, 26/07/2017. Dispõe sobre os requisitos mínimos para o funcionamento dos serviços de vacinação humana. Jul. 2017.

BRASIL. Portaria n° 204, de 17.02.2016. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. **Ministério da Saúde**, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância epidemiológica de eventos adversos pós-vacinação**. Brasília; Ministério da Saúde, ed. 3, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **40 Anos Programa Nacional de Imunizações**. Brasília; Ministério da Saúde, 2013.

CHAVES, E. C. R. *et al.* Avaliação da cobertura vacinal do sarampo no período de 2013-2019 e sua relação com a reemergência no Brasil. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 38, p. e1982, 31 jan. 2020.

COSTA, N. R. *et al.* Measles epidemiological profile in Brasil from 2013 to 2018. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v.66, n. 5, p. 607-614, Mai 2020.

DE CARVALHO, A. L. *et al.* Sarampo: atualizações e reemergência. **Rev. Med. Minas Gerais**, v. 29, n. Supl 13, p. S80-S85, 2019.

DE VRIES, R. D.; DUPREX, W. P.; DE SWART, R. L. Infecções por Morbillivirus: uma introdução. **Vírus**, v. 7, 2. ed., 12 fev., 2015.

DOMINGUES, C. M. A. S. *et al.* Vacina Brasil e estratégias de formação e desenvolvimento em imunizações. **Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília**. v. 28, n. 2: e20190223, 2019.

FERREIRA, R. DA S. B. *et al.* Correlação entre cobertura vacinal e notificações por sarampo no Distrito Federal. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 11, n. 17, p. e1654, 1 nov. 2019.

FITZGERALD, T.J. *et al.* Integrating pharmacies into public health program planning for pandemic influenza vaccine response. **Vaccine**, 34 (46), 5643–5648. 2016.

HIGGINBOTHAM, S., STEWART, A., PFALZGRAF, A. Impact of a pharmacist immunizer on adult immunization rates. **Journal of the American Pharmacists Association**, 52 (3), 367-371. mai./jun. 2012.

MORAES, J. C. de. Sarampo na Europa implicações para o Brasil. **Revista Imunizações SBIM**. Sociedade Brasileira de Imunizações; São Paulo, v. 10, n. 3, p.10-16, 2017.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE - OPAS. Organização Mundial da Saúde. **Região das Américas é declarada livre do sarampo**. 27 de set. 2016. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5248:regiao-das-americas-e-declarada-livre-de-sarampo&Itemid=820. Acesso em: 15 abr. 2020.

PEREIRA, J. P. C.; BRAGA, G. M.; COSTA, G. A. Negligência à vacinação: o retorno do sarampo ao Brasil. **e-Scientia**, Belo Horizonte, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2019. 29

PERSON, O. C.; PUGA, M. Ê. S.; ATALLAH, Á. N. Riscos, benefícios e argumentos para vacinação contra o sarampo: uma síntese de evidências. **Diagn Tratamento**, v. 24, n. 3, p. 102-105, 2019.

RODRIGUES, B. L. P. *et al.* Atualizações sobre a imunização contra o sarampo no Brasil: uma revisão sistemática. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 55, p. e3919-e3919, 2020.

SATO, A. P. S. What is the importance of vaccine hesitancy in the drop of vaccination coverage in Brazil? **Revista de saúde pública**, v. 52, p. 96, 2018.

SATO, H. K. Sarampo. **Revista Imunizações SBIM**, v. 12, n. 3, período de pub, 2019.

SOBRE OS ORGANIZADORES

JOELMA RODRIGUES DE SOUZA

Bacharel em Biomedicina pela Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife – PE; Especialista em Hematologia Clínica e Laboratorial pela Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife – PE; Mestre em Bioquímica pela Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife – PE; Doutora em Ciências pelo Instituto Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz – IAM/FIOCRUZ-PE, Recife – PE. Atua como Docente do Ensino Superior em Imunologia e Hematologia pelo Departamento de Fisiologia e Patologia na Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa – PB.

LÚCIO ROBERTO CANÇADO CASTELLANO

Bacharel em Biomedicina pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM, Uberaba – MG; Mestre e Doutor em Medicina Tropical e Infectologia pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM, Uberaba – MG. Atua como Professor Efetivo do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico da Escola Técnica de Saúde da UFPB, Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa – PB.

MARCOS VINÍCIUS DA SILVA

Bacharel em Biomedicina pela Universidade de Uberaba, Uberaba-MG; Mestre e Doutor em Medicina Tropical e Infectologia pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM, Uberaba – MG. Atua como Professor Efetivo do Ensino Superior no Instituto de Ciências Biológicas e Naturais, Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM, Uberaba – MG.

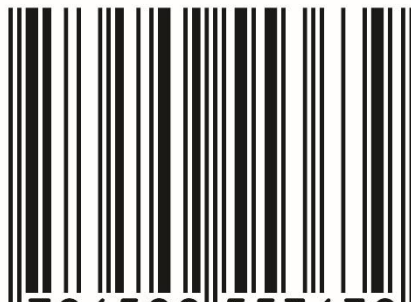


CONTATOS:

<https://creativeeventos.com.br/editoracreative/>
editora@creativeeventos.com.br

ISBN: 978-65-995536-3-9

CR



9 786599 553639