

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE FARMÁCIA

EMANUELA CARLA DA SILVA LUIZ

**VACINAS DO TIPO PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS (*VLP*) À
BASE DE PLANTAS: UMA REVISÃO**

JOÃO PESSOA - PB

Fevereiro de 2024

EMANUELA CARLA DA SILVA LUIZ

VACINAS DO TIPO PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS (VLP) À
BASE DE PLANTAS: UMA REVISÃO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação em
Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde, da
Universidade Federal da Paraíba, como parte
dos requisitos para obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior

JOÃO PESSOA-PB

Fevereiro de 2024

EMANUELA CARLA DA SILVA LUIZ

VACINAS DO TIPO PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS (VLP) À BASE DE PLANTAS: UMA REVISÃO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação em
Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde, da
Universidade Federal da Paraíba, como parte
dos requisitos para obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia.

Aprovado em 16 de fevereiro de 2024.

Prof. Orientador: Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior
Universidade Federal da Paraíba- UFPB

Prof.^a Dr.^a Silvana Teresa Lacerda Jales
Universidade Federal da Paraíba- UFPB

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães
Universidade Federal da Paraíba- UFPB

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L953v Luiz, Emanuela Carla da Silva.

Vacinas do tipo partículas semelhantes a vírus (VLP)
à base de plantas : uma revisão / Emanuela Carla da
Silva Luiz. - João Pessoa, 2024.
67 f. : il.

Orientação: Francisco Humberto Xavier Júnior.
TCC (Graduação) - UFPB/CCS.

1. Imunização. 2. Vacinas. 3. Plantas. 4. VLPs. 5.
Produção. I. Xavier Júnior, Francisco Humberto. II.
Título.

UFPB/CCS

CDU 604.4:615.371(043.2)

DEDICATÓRIA

**Dedico aos animais sencientes que
ainda são utilizados demasiadamente
como produtos em todo o mundo.**

AGRADECIMENTOS

Eu tive uma longa trajetória até chegar aqui. E no decorrer desses anos, tiveram inúmeras pessoas com quem compartilhei um pouco desse caminho. Agradeço a todas elas, pois são parte de uma fase que se conclui.

Agradeço a minha mãe, Antônia da Silva que é a inspiração do meu amor. Agradeço ao meu falecido pai, meus irmãos e padrasto.

Agradeço ao meu companheiro Herick Cunha por estar ao meu lado em tantos momentos.

Agradeço a experiência de conviver com os animais que tutelo. Essa troca mútua é um acalento e deixa a vida mais leve.

Agradeço aos amigos que conheci na graduação; Fernando Lima, Gabriella Melquíades e Ícaro Vasconcelos. Foi muito bom dividir a vivência acadêmica com vocês e consolidar vínculos.

Agradeço à banca, formada por professores de tanta excelência. Tenho profundo carinho e admiração por vocês; Humberto Xavier, Silvana Jales e Hemerson Iury.

E por fim, agradeço a mim por ter continuado a seguir.

LUIZ, E.C.S. Vacinas do tipo partículas semelhantes a vírus (VLP) à base de plantas: uma revisão. Curso de Farmácia. Trabalho de conclusão de curso. UFPB/CCS. João Pessoa/PB, 2024.

RESUMO

As vacinas desempenham um papel crucial na prevenção de doenças infecciosas e na promoção da saúde pública. Seus benefícios são vastos e variados, desde a proteção individual até a contribuição para a imunidade coletiva. Ao estimular o sistema imunológico a reconhecer e combater agentes patogênicos específicos, as vacinas ajudam a prevenir doenças graves, reduzindo a morbidade e mortalidade associadas a diversas enfermidades. No entanto, apesar do sucesso alcançado com as vacinas tradicionais, ainda existem fatores a serem aprimorados para maximizar eficácia e alcance dos imunizantes. Dessa forma, há uma demanda para novas abordagens na produção e desenvolvimento de vacinas. O objetivo deste trabalho foi elaborar uma revisão bibliográfica sobre vacinas, com destaque para as vacinas do tipo partículas semelhantes a vírus (VLPs) baseadas em plantas. Todo embasamento teórico é de caráter descritivo sendo construído a partir de materiais disponíveis nos bancos de dados: PubMed, *Science Direct* e *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Os tópicos expostos foram: histórico, tipos de vacinas, plataformas e a importância das vacinas. Além de conhecimentos específicos que discutem a conceitualização de VLP's, sistemas de expressão em plantas, estudos clínicos, mercado e desafios que as vacinas vegetais enfrentam. Vacinas VLP's à base de plantas é uma tecnologia em crescimento de aspecto inovador e promissor para o desenvolvimento de imunizantes. Diante do exposto, foi possível observar que esta abordagem aproveita as vantagens das plantas como sistemas de expressão, levando a vacinas potencialmente mais seguras, eficazes, acessíveis e sustentáveis para uma variedade de doenças infecciosas. Além disso, as vacinas VLPs de plantas podem ajudar a superar desafios logísticos e de distribuição, especialmente em regiões com infraestrutura limitada, contribuindo para a saúde global e reduzindo a carga de doenças. Essa área de pesquisa também pode impulsionar a inovação biotecnológica e promover avanços na medicina preventiva.

Palavras-chave: imunização; vacinas; plantas; vlps; produção.

ABSTRACT

Vaccines play a crucial role in preventing infectious diseases and promoting public health. Their benefits are vast and varied, ranging from individual protection to contributing to herd immunity. By stimulating the immune system to recognize and combat specific pathogens, vaccines help prevent serious illnesses, reducing morbidity and mortality associated with various diseases. However, despite the success achieved with traditional vaccines, there are still factors to be improved to maximize efficacy and reach of immunizations. Thus, there is a demand for new approaches in vaccine production and development. The aim of this work was to conduct a comprehensive literature review on vaccines, with a focus on virus-like particle (VLP) vaccines based on plants. All theoretical basis is descriptive and built from materials available in databases such as PubMed, Science Direct, and the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The topics covered include the history, types, platforms, and the importance of vaccines. In addition to specific knowledge discussing the conceptualization of VLPs, expression systems in plants, clinical studies, market, and challenges facing plant vaccines. Plant-based VLP vaccines are a growing, innovative, and promising technology for vaccine development. This approach leverages the advantages of plants as expression systems, leading to potentially safer, more effective, accessible, and sustainable vaccines for a variety of infectious diseases. Furthermore, plant-based VLP vaccines can help overcome logistical and distribution challenges, especially in regions with limited infrastructure, contributing to global health and reducing the burden of diseases. This area of research can also drive biotechnological innovation and promote advances in preventive medicine.

Keywords: immunization; vaccines; plants; vlps; production.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Características imunogênicas de VLPs apresentadoras de antígenos.	30
Figura 2 - Transformação mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e inoculação mecânica em <i>Nicotiana benthamiana</i>	34
Figura 3 - Principais sistemas de expressão em plantas.	36

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Diferentes tipos de vacinas	26
Quadro 2 - Vantagens e desvantagens dos sistemas de expressão de plantas utilizados na produção de vacinas do tipo VLPs	40
Quadro 3 - Vacinas VLPs à base de plantas em estudos pré-clínicos.	43
Quadro 4 - Vacinas VLPs à base de plantas em estudos clínicos de fases I, II ou III.	47
Quadro 5 - Vacinas VLPs à base de plantas para epidemias em estudo pré-clínico.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BALB/C - camundongos albinos

cEDIII - domínio III da glicoproteína de envelope do vírus da dengue

Covid-19 - doença do coronavírus 2019

HBV - vírus B da hepatite

HPV - papilomavírus humano

LcrV - proteína V de baixa resposta ao cálcio

LickM - molécula transportadora da enzima termoestável liquenase

OGM - organismos geneticamente modificados

PCV2 - circovírus suíno tipo 2

PMF - agricultura molecular de plantas

Pfs25 - Plasmodium falciparum surface de peso molecular 25

PPV - parvovírus suíno

PRNT - teste de neutralização por redução de placa

QIV - vacina quadrivalente inativada

Qpcr - reação em cadeia de polimerase em tempo real

QVLP - partículas semelhantes a vírus quadrivalentes

tHBcAg - antígeno central da hepatite B

TRA - atividade redutora de transmissão

SARS-CoV-2 – coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave

VLP - partículas semelhantes a vírus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
3 METODOLOGIA	12
4 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
4.1 VACINAS	13
4.1.1 Histórico.....	16
4.1.2 Importância das vacinas na imunização	21
4.1.3 Plataformas de produção das vacinas	22
4.1.4 Tipos de vacinas	23
4.2 VLPS: CONCEITUALIZAÇÃO	28
4.3 PLANTAS	31
4.4 SISTEMAS DE EXPRESSÃO.....	35
4.4.1 Expressão estável	36
4.4.2 Expressão transitória.....	37
4.4.3 Expressão plastidial.....	39
4.5 MERCADO E TESTES CLÍNICOS	41
4.6 DESAFIOS E PERSPECTIVAS PARA IMUNIZANTES VLP'S VEGETAIS.	54
5 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Ao decorrer da história humana, as vacinas demonstraram ser um instrumento importante contra muitas doenças transmissíveis. As campanhas tradicionais de vacinação alcançaram êxito ao erradicar ou reduzir a incidência de várias doenças prevalentes (Ayres *et al.*, 2020).

O impacto positivo das vacinas é um fator inegável para a sociedade e o uso desses imunizantes traz benefícios que elevam a qualidade de vida e longevidade de pessoas e animais (Fernandes *et al.*, 2021). Resultado de longos anos de investimentos em pesquisas, juntamente com o desenvolvimento científico e tecnológico, fizeram das vacinas ferramentas seguras e cruciais para a saúde pública.

No entanto, uma série de patologias de relevância e consideradas evitáveis pela vacinação causam impacto epidemiológico significativo. Em geral, os custos são o principal obstáculo para a vacinação universalizada e ao serem somados com limitações do tipo: baixa imunogenicidade gerada por alguns tipos de vacinas, eficácia reduzida, proteção que não se estende a novas cepas patogênicas, necessidade de repetições de outras doses e reações alérgicas, formam entraves que atrasam a criação de vacinas para outras patologias ocorrentes no mundo e que ainda não possuem prevenção e tratamento (D'Amico *et al.*, 2021).

A adoção de tecnologias baseadas em plantas para o desenvolvimento e produção de vacinas de uma lista extensa de doenças que podem ser prevenidas por meio de imunização, é uma área de grande potencial e oportunidades na biotecnologia farmacêutica (Govea-Alonso; Rybicki; Rosales-Mendoza, 2014). O desenvolvimento de vacinas à base de plantas contra doenças tropicais negligenciadas é identificado como uma prioridade chave para a exploração desta tecnologia, uma vez que podem ser produzidas formulações de baixo custo para combater estas doenças que afetam principalmente as populações de baixo poder aquisitivo (Rosales- Mendoza *et al.*, 2020).

Partículas semelhantes a vírus (VLPs) são uma nova geração de vacinas que se mostram seguras e podem ser rapidamente produzidas em sistemas de expressão heterólogos. O uso de plantas oferece benefícios potenciais em comparação com os sistemas tradicionais de cultura celular que necessitam de meios dispendiosos e

instalações de alto nível em biossegurança. Plantas podem ser amplificadas em estufas ou fazendas verticais e gerar rendimentos na escala de toneladas. Outra vantagem valiosa das plantas, é de serem substancialmente seguras pelo fato de nenhum patógeno humano ter a capacidade de se replicar nelas, eliminando o risco de contaminação por endotoxinas virais, príons ou bacterianas (Stander; Mbewana; Meyers, 2022).

A expressão transitória usada como sistema de expressão em plantas permite a geração rápida de produtos que são alcançados em cerca de 8 semanas a partir da obtenção da sequência genética. Esse sistema leva a glicosilação de proteínas expressas, permitindo o dobramento e montagem adequadas de VLPs, o que ocasiona na produção rápida de proteínas com altos rendimentos, escalabilidade elevada, baixo custo e maior segurança devido ao risco de acidentes serem menores (Hemmati *et al.*, 2022).

É importante destacar que a produção de vacinas VLPs baseadas em plantas enfrenta desafios significativos, incluindo a otimização da expressão, montagem das partículas, purificação dos produtos finais, regulamentação e aprovação destas vacinas. Superar esses desafios requer avanços contínuos em tecnologias de expressão de proteínas em plantas, métodos de purificação, ensaios de qualidade e conformidade com os padrões regulatórios e éticos estabelecidos para produtos farmacêuticos.

Neste trabalho, será realizada uma revisão sobre as vacinas, em especial das derivadas de partículas semelhantes a vírus (VLP's) de origem vegetal, mostrando os sistemas de expressão, vantagens e limitações de uma plataforma ainda pouco explorada, mas que apresenta promissora aplicação em saúde.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Elaborar uma revisão bibliográfica acerca de vacinas em especial as do tipo partículas semelhantes a vírus (VLPs) à base de plantas.

2.2 Objetivos específicos

Discorrer sobre as características e processo de produção de vacinas;

Demonstrar a aplicabilidade das vacinas VLPs à base de plantas considerando custos, escalabilidade e flexibilidade de produção;

Reunir informações sobre VLPs vegetais como uma tecnologia promissora em processo, apresentando pontos relevantes no seu desenvolvimento;

Mostrar o andamento das VLPs à base de plantas no mercado de testes pré-clínicos e clínicos.

3 METODOLOGIA

Foi elaborada uma revisão bibliográfica descritiva sobre o tema a partir de informações extraídas de bancos de dados da literatura eletrônica como: PubMed, *Science Direct* e *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Foram utilizados cinco descritores relacionados à temática: vacinas, imunização, VLPs, plantas e produção, ambos em português e inglês. Esses descritores conduziram a uma série de estudos, incluindo artigos, dissertações e teses filtrados dos últimos sete anos que foram usados como base deste trabalho.

Outros recursos incluíram livros, revistas e materiais científicos de órgãos nacionais e internacionais de referência à temática como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e Agência de Alimentos e Medicamentos (FDA).

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Vacinas

Vacinas são produtos biológicos que ao serem inseridos no organismo, desencadeiam uma resposta no sistema imunológico que induz a produção de anticorpos (Fiocruz, 2022). Nesse processo o organismo torna-se imune ao agente patogênico e as doenças causadas por ele, de maneira análoga à resposta que ocorreria em uma infecção provocada por um patógeno.

As vacinas são produzidas utilizando microrganismos enfraquecidos, mortos ou a partir de alguns de seus derivados, que ao sofrerem modificações em laboratório perdem sua capacidade de gerar doenças. Dessa forma, cria-se uma proteção artificial induzida pela vacinação que não traz risco à pessoa imunizada e ao mesmo tempo evita a transmissão da doença para outros indivíduos (Homma *et al.*, 2020).

Com a vacinação, o sistema imunológico estimula a produção de anticorpos antes mesmo do indivíduo ser exposto ao microrganismo causador de uma determinada doença. Isso ocorre porque primeiramente a pessoa entra em contato com o microrganismo presente na vacina na sua forma atenuada ou inativa. Desse modo, o sistema imunológico irá produzir células de memória e anticorpos, sem a capacidade de gerar a doença em si. Com isso, quando houver a exposição do indivíduo ao microrganismo uma segunda resposta vai ser gerada, mas sem que o imunizado adoeça ou manifeste a doença na sua forma grave, justamente porque o seu corpo já possui memória imunológica contra aquele patógeno (Ribeiro, 2019).

É fundamental conhecer a história das doenças e as estratégias de sua eliminação ao longo dos séculos, isso amplia o entendimento das pessoas sobre a importância da vacinação e adesão aos programas de imunização. Ao exemplificar essa colocação, podemos usar o caso da erradicação da varíola no mundo que é a maior conquista de saúde pública a nível global (Fernandes *et al.*, 2021).

Durante o período das epidemias de varíola na Europa entre os séculos XVII e XVIII, no ano de 1721, Lady Mary Wortley Montagu introduziu na Inglaterra a prática da variolação, que consistia em inocular na pele de pessoas sãs, um líquido extraído das crostas de varíola de um paciente infectado. O método era praticado para a doença ser manifestada de forma branda em comparação à forma natural (Delves,

2018). Mais adiante, em 1978, Edward Jenner observou que contato de agricultores com o gado e as vacas, expunha os trabalhadores a varíola bovina e varíola das vacas. O estudioso notou que os camponeses que ordenhavam vacas e haviam adquirido a forma animal da doença, não adquiriam a varíola humana (Sampedro *et al.*, 2015). Assim, em 1796 Jenner realizou um experimento que ao extrair o pus da mão de Sarah Nelmes (ordenhadeira) e introduzindo na pele James Phipps, de oito anos, notou que o menino contraiu a doença na sua forma atenuada e logo depois, foi curado (Thèves; Biagini; Crubézy, 2014).

A relação causa-efeito entre patógenos e doenças foi somente estabelecida por Louis Pasteur e Robert Koch, por volta de 1870. Porém, as investigações feitas anteriormente por Edward Jenner, fez Pasteur dar o nome de vacinas, qualquer preparação composta por agentes que promovam a imunização de uma doença infecciosa (Feijó; Sáfiadi, 2006). Já por volta de 1880, as pesquisas de Louis Pasteur voltadas para a vacina contra a raiva, marcam uma era de intenso progresso ligado às vacinas. A partir de então, em meados do século XX uma gama de vacinas para diferentes doenças foi desenvolvida, entre elas: vacinas contra a cólera, febre tifoide, difteria, coqueluche, febre amarela, poliomielite, sarampo, caxumba e rubéola. Essas vacinas foram desenvolvidas por métodos de inativação das bactérias, por toxinas bacterianas neutralizadas com formaldeído e vírus atenuados (Fernandes *et al.*, 2021).

A classificação das vacinas é definida em três gerações. As vacinas de primeira geração são aquelas que contêm o agente patológico na sua forma completa, porém submetidas a processos que inativam ou enfraquecem os microrganismos. Nessa categoria, microrganismos não patogênicos oriundos de diferentes hospedeiros são usados estrategicamente como antígenos em vacinas destinadas a controlar doenças causadas por patógenos semelhantes. Isso pode ser exemplificado nas vacinas contra a tuberculose, onde a bactéria *Mycobacterium bovis* (BCG), originalmente presente em bovinos, é utilizada (Homma *et al.*, 2020). Neste grupo, encontram-se vacinas contra coqueluche, varíola, poliomielite, sarampo, rubéola, entre outras. No que diz respeito às vacinas de segunda geração, elas consistem em subunidades de patógenos que contêm exclusivamente proteínas ou fragmentos de proteínas desses microrganismos. As vacinas desse grupo estimulam a produção de anticorpos direcionados a um alvo específico, como uma toxina que causa os sintomas da doença

ou açúcares encontrados na superfície dos patógenos. Esses anticorpos capacitam o sistema imunológico a neutralizar e eliminar as bactérias que, em outros casos, se multiplicariam rapidamente antes mesmo de serem identificadas pelas principais defesas imunológicas do nosso organismo (Homma *et al.*, 2020). O destaque desse grupo são as vacinas acelulares que utilizam toxóides (toxinas purificadas e inativadas por processos químicos), proteínas e polissacarídeos purificados. Outros exemplos são as vacinas contra o tétano, difteria, hepatite B, pneumonia e meningite meningocócica. Por fim, as vacinas mais atuais, as de terceira geração, utilizam informações genéticas do patógeno para codificar proteínas que apresentam antígenos relevantes para sua proteção. Essas vacinas são conhecidas como vacinas de DNA ou vacinas gênicas (Diniz; Ferreira, 2010).

Quanto à imunização, este processo é classificado como ativo ou passivo. Na resposta ativa, o sistema imune reage à invasão de patógenos, ativando as células do sistema imunológico adaptativo, em particular os linfócitos, que vão produzir anticorpos destinados a combater os antígenos. Essa imunidade é adquirida após a exposição a um antígeno ou agente infeccioso, seja através de uma infecção natural ou através da vacinação. Quando a imunização resulta de uma infecção natural, é chamada de imunidade ativa natural. Já quando a resposta imune provocada pelas vacinas estimula o sistema imunológico a produzir anticorpos específicos sem causar a doença no indivíduo, ela é conhecida como imunidade ativa artificial (Silva, 2014).

A imunização passiva envolve a administração ou transferência de anticorpos direcionados a combater antígenos ou o agente infeccioso. Nesse tipo de imunidade, o receptor dos anticorpos não teve contato anterior com o antígeno, o que significa que a proteção adquirida tem uma duração limitada. Isso pode ocorrer de forma natural, como a imunidade que protege fetos e recém-nascidos por meio da transferência de anticorpos produzidos pela mãe ou de maneira artificial, como os soros, formados por anticorpos coletados e transferidos para um organismo que não possui imunidade total ao antígeno que desencadeou a resposta imunológica. A imunidade passiva é instantânea, uma vez que não há exposição direta ao antígeno, não ocorre a ativação de células de memória. Como resultado, algumas semanas após a administração, os níveis de anticorpos tendem a diminuir, conferindo imunidade de caráter temporário (Kayser; Ramzan, 2021).

Outro aspecto de relevância nas vacinas é o seu processo de fabricação, no qual se produz o ingrediente farmacêutico ativo (IFA). O insumo varia dependendo se a vacina usa vírus atenuados ou inativados, o que envolve a replicação celular, purificação e, se necessário, inativação. No caso de vacinas bacterianas, a produção ocorre por meio de um processo de fermentação (Duarte, 2021). As vacinas tradicionais utilizam patógenos vivos, mortos ou atenuados/modificados. Contudo, vacinas de subunidades recombinantes produzidas em células geneticamente modificadas estão ganhando preferência devido a benefícios como maior segurança, redução da competição de antígenos e a capacidade de direcionar as vacinas para locais específicos (Yusibov; Kushnir; Streatfield, 2014). Algumas vacinas possuem adjuvantes para aprimorar a resposta imunológica. Conservantes também são adicionados para evitar contaminação após a abertura, e, estabilizantes para impedir possíveis reações químicas. Já outros imunizantes requerem um líquido diluente para ajustar a concentração da vacina antes da sua administração (Cid; Bolívar, 2021).

O desenvolvimento de uma vacina passa por quatro etapas: a fase pré-clínica, fase clínica 1, 2 e 3. Na pré-clínica a vacina é testada em animais para validar sua capacidade de induzir uma resposta imune protetora e garantir sua segurança. Na fase 1 a vacina é avaliada em um pequeno grupo de voluntários saudáveis para determinar a dose correta, segurança e capacidade de provocar uma resposta imune. Na fase 2 mais de 100 participantes são envolvidos para continuar avaliando a segurança e a resposta imune da vacina. Já na fase 3, a vacina é testada em milhares de participantes e comparada com um grupo que recebe o placebo. Nesta terceira fase, a eficácia da vacina para combater a doença-alvo é determinada (PUCRS, 2021). É importante salientar que mesmo com sua aprovação, as vacinas continuam sendo monitoradas, garantindo sua eficácia e segurança a longo prazo.

4.1.1 Histórico

O início

É provável que a história da vacinação tenha se originado a partir de crenças homeopáticas que preconizavam o uso de doses reduzidas de um patógeno microbiano como meio de proteção contra o próprio microrganismo. Tal princípio foi corroborado empiricamente por meio do consumo controlado de pequenas

quantidades de veneno, visando prevenir a intoxicação intencional e fatal de líderes por parte dos seus rivais (Plotkin, 2005). Na Grécia Antiga, o historiador Tucídides observou que aqueles que cuidavam dos doentes, frequentemente, eram pessoas que já haviam sido infectadas e curadas, desenvolvendo assim imunidade contra a doença (Delves, 2018).

As primeiras práticas de variação foram descritas no século IV na China, nesse período, populares inalavam o pó (insuflação) extraído das crostas das feridas de enfermos para se protegerem de infecções futuras. Mais tarde, no século VII na Índia, o material da crosta de varíola era inoculado em pequenas lesões na pele de outros indivíduos (Fenner *et al.*, 1988). Esse método foi definido como variação e se propagou na Europa ocidental, sendo introduzido na Inglaterra e posteriormente nos Estados Unidos até ser investigado de forma mais aprofundada pelo médico Edward Jenner (Sampedro *et al.*, 2015).

Século XVIII - Edward Jenner e a Descoberta da Vacinação

No século XVIII, a varíola começou a se espalhar por toda a Europa, causando milhões de mortes (Thèves; Biagini; Crubézy, 2014). Nessa época, mais precisamente em 1786, Jenner desenvolveu as primeiras etapas do processo de vacinação. Ele inoculou uma criança com pus retirado da mão de um trabalhador rural que havia sido infectado com varíola bovina (cowpox) após o contato com as mamas de vacas doentes. Três meses depois, Jenner inoculou a mesma criança com varíola humana, e a criança não desenvolveu a doença, demonstrando assim a eficácia da imunização. Nas duas décadas seguintes, Jenner conduziu experimentos sistemáticos que levaram ao estabelecimento do método de vacinação, substituindo a inoculação. Na Europa, em conjunto com a vacinação e a variação, procedimentos como quarentena e isolamento de infectados ajudaram a reduzir a propagação da varíola (Thèves; Biagini; Crubézy, 2014).

Século XIX - Louis Pasteur e o Avanço da Vacinação

Já por volta de 1870, Louis Pasteur e Robert Koch conseguiram criar um marco no avanço no estudo de vacinas: estabelecer a conexão direta entre a presença de microrganismos patogênicos e o surgimento de doenças (Feijó; Sáfiadi, 2006). Um exemplo notável desse avanço ocorreu quando várias aves foram inoculadas com uma cultura envelhecida de bacilos de cólera aviária, que havia sido esquecida em uma bancada, perdendo boa parte de sua capacidade patogênica.

Surpreendentemente, essas aves tornaram-se resistentes a culturas frescas do bacilo (Delves, 2018).

Pasteur formulou a hipótese de que patógenos poderiam ser enfraquecidos por exposição a agressores ambientais como alta temperatura, oxigênio e produtos químicos. Seus estudos posteriores sobre o antraz e a raiva confirmaram essa hipótese (Plotkin, 2005).

Na última década do século XIX, a geração de vacinas começou a ter respaldo científico, graças a contribuições - baseadas nas observações de Pasteur - de diversos grupos da Grã-Bretanha, Alemanha, Estados Unidos e França. Nesse período, desenvolveram-se métodos essenciais para inativar bactérias, permitindo o uso delas como matéria-prima para vacinas. Isso levou à produção e teste de vacinas inativadas para febre tifoide, cólera e peste no final do século (Kayser; Ramzan, 2021)

Século XX - Desenvolvimento de Vacinas Vivas Atenuadas, Inativadas e Cultura Celular

No Brasil, no início do século XX (1904), o Rio de Janeiro enfrentava graves problemas de saneamento e epidemias. O médico Oswaldo Cruz foi designado pelo presidente do país a liderar esforços em saneamento na cidade, implementando a obrigatoriedade da vacinação contra a varíola. Essa medida gerou resistência por parte da população levando a confrontos violentos entre manifestantes e autoridades, resultando em diversas mortes e prisões (Silva, 2014).

Ainda no século XX, novas abordagens surgiram, incluindo vacinas de subunidades, toxóides, polissacarídeos capsulares e proteínas purificadas.

A descoberta das toxinas bacterianas também impulsionou pesquisas sobre a produção de antitoxinas capazes de neutralizar essas toxinas ou a replicação bacteriana. Em 1929, Bárbara Hopkins e Alexander Glennie acidentalmente descobriram a capacidade do formaldeído em inativar toxinas, enquanto buscavam uma maneira de combater a difteria, uma doença causada por uma toxina bacteriana. Ao limparem recipientes de armazenamento com formaldeído, perceberam que a toxina se tornava menos infecciosa. Isso permitiu a produção de um antígeno baseado na toxina diftérica inativada por formalina, desenvolvido por Gaston Ramon (Fernandes *et al.*, 2021).

Na metade do século XX, a cultura de células começou a ser usada para o cultivo de vírus, e logo se viu que essa abordagem também poderia atenuar os vírus, tornando-os menos infecciosos. Esse processo ocorria possivelmente devido à seleção accidental de mutações do vírus mais adequados à replicação em laboratório do que em hospedeiros vivos. Essa descoberta permitiu a seleção controlada de vírus atenuados e posteriormente, entre 1950 e 1980, o desenvolvimento de importantes vacinas, incluindo as da poliomielite (oral de Sabin), sarampo, rubéola, caxumba e varicela (Plotkin, 2005).

A chegada da biologia molecular e da engenharia genética teve um impacto significativo no desenvolvimento de vacinas. Isso abriu novas possibilidades para criar antígenos inativados e para enfraquecer organismos de maneira controlada por meio de mutações direcionadas (Kayser; Ramzan, 2021).

A engenharia genética, pioneiramente desenvolvida por Stanley Cohen e Herbert Boyer, possibilitou a criação da primeira vacina recombinante, onde uma proteína do vírus da hepatite B foi expressa em grande quantidade em células de mamíferos e levedura. Maurice Hilleman já havia criado uma vacina da hepatite B por meio da purificação e inativação do vírus, mas com riscos de segurança devido ao uso de sangue de doadores. Posteriormente, outras vacinas importantes para a saúde pública foram desenvolvidas usando engenharia genética, incluindo vacinas contra o papilomavírus humano (HPV), produzidas por partículas semelhantes a vírus (VLPs) (Fernandes *et al.*, 2021).

Século XXI - O estado atual

No século XXI, a pesquisa e desenvolvimento de vacinas têm se beneficiado dos avanços em tecnologias de sequenciamento e síntese de ácidos nucleicos, levando ao aumento no desenvolvimento de vacinas baseadas em material genético, como vacinas de RNA e DNA. Essas vacinas estimulam o sistema imunológico sem causar a doença (Ghattas *et al.*, 2021).

Em março de 2020, a COVID-19 (doença do coronavírus 2019) foi caracterizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma pandemia. A pandemia da COVID-19 acarretou numa série de problemas econômicos, sociais e mentais, decorrentes de medidas de proteção contra o vírus SARS-CoV-2 (coronavírus 2 – síndrome respiratória aguda grave), como quarentenas e isolamentos sociais (Roberts *et al.*, 2022). De lá até fevereiro de 2024, o vírus já infectou mais de

770 milhões de pessoas no mundo, causou mais de 7 milhões de mortes, sendo o Brasil o segundo país com maior número de óbitos, registrando mais de 702 mil mortes (OMS, 2024).

Em apenas 11 meses após a identificação do vírus, o surpreendente esforço da comunidade científica levou ao desenvolvimento de mais de 300 projetos de vacinas, dos quais 40 prosseguiram para avaliação clínica (Forni; Mantovani, 2021). A colaboração entre cientistas e a indústria farmacêutica durante a pandemia de COVID-19 resultou no rápido desenvolvimento, aprovação e distribuição global de vacinas altamente eficazes. Essas vacinas têm sido fundamentais para prevenir casos graves da doença, permitindo a reabertura segura de economias e comunidades. Além disso, destacou-se a importância da cooperação internacional e da inovação científica na resolução de desafios globais de saúde pública (Butantan, 2022).

Em contrapartida, durante a pandemia da COVID-19, a desinformação produzida pelas falsas notícias conhecidas pelo termo de *fake news* foram responsáveis pela hesitação da população em se vacinar contra o vírus (Teixeira, 2018). As *fakes news* desempenharam um papel significativo na disseminação de mentiras sobre a doença, suas vacinas e tratamentos não comprovados. No Brasil, figuras públicas, autoridades políticas e cidadãos comuns, utilizaram as redes sociais como veículo de dispersão de informações falsas em grande escala (Santana *et al.*, 2023). Essas condutas foram responsáveis pela não adesão de uma parte da população à vacinação, tornando-a mais suscetíveis ao vírus, aumentando os índices de desenvolvimento de sintomas graves da doença, hospitalização - sobrecarregando o sistema de saúde - e ocorrência de mortes (Fonseca; Shalden; Bastos, 2021). Porém, à medida que mais pessoas foram vacinadas e as vacinas se tornaram mais disponíveis, houve uma redução na propagação do vírus, culminando na declaração pela OMS do fim da emergência global da COVID-19 (OMS, 2023).

Apesar de hoje termos uma proteção estabelecida contra a COVID-19, o movimento antivacinas ainda é forte e é considerado pela OMS uma das 10 principais ameaças à saúde global (Castillo; Santos; Castro, 2020). Isso reforça que a promoção da educação contínua e de campanhas de comunicação focadas na melhoria do entendimento e opinião pública sobre vacinas são medidas essenciais para o aumento da adesão à vacinação contra doenças transmissíveis.

4.1.2 Importância das vacinas na imunização

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em virtude dos atuais programas de imunização, aproximadamente, 3 milhões de pessoas são salvas a cada ano no mundo (Pollard; Bijker, 2020).

A importância de se vacinar não está atrelada apenas a uma decisão individual, essa é uma escolha que engloba uma ação coletiva em diferentes eixos. A Constituição Federal de 1988 afirma que todo cidadão possui direitos e deveres, assim, ao vivermos em sociedade é necessário que algumas medidas sejam cumpridas de forma a minimizar riscos para a comunidade. É também responsabilidade do poder público nas suas diferentes esferas governamentais (municipal, estadual e federal) ter políticas públicas direcionadas a campanhas de vacinação para a prevenção de doenças. Profissionais de saúde não estão isentos e precisam zelar por sua saúde, pois são trabalhadores que lidam diretamente com pacientes e enfermos. Da mesma forma, a indústria de vacinas, que tem a responsabilidade de fornecer um produto validado por ensaios clínicos e que siga as Boas Práticas de Fabricação (BPF), garantindo segurança e eficácia dos seus imunizantes (Fernandes *et al.*, 2021).

O sucesso da vacinação também impede o colapso do sistema de saúde, pois seu objetivo primário, protege o indivíduo e a comunidade de inúmeras doenças, além de ser responsável por impedir a progressão dos sintomas graves, de maneira que o quadro clínico do paciente seja brando e sem a necessidade de hospitalização (Schatzmayr, 2003).

Outras abordagens associadas à prevenção de doenças também evitam que o sistema de saúde fique sobrecarregado, a exemplo das medidas higiênico-sanitárias acrescidas do distanciamento social que foram utilizados na pandemia de COVID-19. Sem dúvida, a vacina é a ferramenta de maior impacto nesse cenário, mas numa epidemia outras condutas são somadas à população. Além de que, pessoas alérgicas a algum ingrediente da vacina e com patologias debilitantes no sistema imunológico, não devem usar vacinas específicas (Muthamilselvan; Khan; Hwang, 2023).

Assim, indivíduos vacinados criam uma barreira de proteção mesmo para os não imunes, fazendo com que diminua a circulação do agente causador da doença e

protegendo indiretamente os que não estão imunizados, esse processo é denominado como imunidade de rebanho (Yusibov; Rabindran, 2008).

Com a vacinação há controle, eliminação e até mesmo erradicação de doenças. No controle ocorre a redução da incidência de uma certa patologia. Na eliminação há a interrupção da propagação de uma doença em determinado território, porém, mudança no comportamento do vetor ou falhas nas práticas de controle podem reintroduzir a doença naquela região. Por fim, a erradicação que consiste na incidência reduzida a zero de uma determinada doença, ou seja, essa patologia passa a ser inexistente e o seu vetor é extinto (Ayres *et al.*, 2020). Desta maneira, é importante que vacinas sejam eficazes, acessíveis, com proteção imunológica elevada, número alto de produção, acrescida de boa estabilidade, baixos efeitos colaterais e de fácil administração.

4.1.3 Plataformas de produção das vacinas

Diferentes vacinas direcionadas ao mesmo patógeno podem contar com estratégias de desenvolvimento diferentes. No mercado, basicamente existem dois tipos de plataformas, sendo elas vacinas virais e bacterianas.

Vacinas virais precisam de uma célula para serem desenvolvidas, o vírus não cresce sem outro agrupamento celular (células de mamíferos e plantas, por exemplo). Nas vacinas virais normalmente plataformas de ovos embrionados de galinha e linhagens celulares do tipo vero são usadas. O vírus então infecta a célula, se multiplica e gera o antígeno. Depois do crescimento e desenvolvimento do vírus, é feito o isolamento das células e do meio utilizando lise química, centrifugação, filtração ou homogeneização (Prates-Syed *et al.*, 2021).

As plataformas virais clássicas compreendem vacinas inativadas, atenuadas, proteicas como as de subunidade e partículas que se assemelham a vírus. Por outro lado, as novas abordagens tecnológicas englobam o uso de DNA recombinante, tecnologia reversa, conjugação química, genômica e proteômica, que vem sendo responsáveis pela criação da maioria das vacinas recentes, muitas das quais estão protegidas por patentes. Uma grande vantagem dessas novas plataformas é sua independência do cultivo viral, uma vez que podem ser produzidas com base nas

informações genéticas dos vírus, o que resulta na produção e oferta mais ágeis de vacinas (Endo *et al.*, 2021).

Já nas plataformas bacterianas não há necessidade de células receptoras. As bactérias não precisam da maquinaria de reprodução de outra célula, pois elas conseguem crescer e se multiplicarem quando inseridas em meios de culturas. O crescimento ocorre nos biorreatores em ambiente com pH, temperatura e oxigenação controlados. Depois de alcançar um número adequado de bactérias para desenvolver a vacina, é efetuado o isolamento das bactérias por centrifugação ou coleta de polissacarídeos (Massa; Presenti; Benvenuto, 2018).

O uso de bactérias aumenta a imunidade contra as próprias bactérias ou contra as toxinas que produzem. Na primeira, há diminuição da capacidade de infecção bacteriana, tornando o organismo mais resistente a elas. Enquanto as segundas, vão neutralizar as toxinas que as bactérias liberam. Essas vacinas podem incluir polissacarídeos capsulares, toxinas inativadas, bactérias mortas ou bactérias vivas enfraquecidas (Endo *et al.*, 2021).

4.1.4 Tipos de vacinas

As vacinas podem ser classificadas de acordo com sua habilidade de se replicar no hospedeiro ou com base na tecnologia/plataforma empregada na sua fabricação (Ghattas *et al.*, 2021).

As vacinas tradicionais empregam um ou múltiplos antígenos obtidos a partir de patógenos que foram inativados ou enfraquecidos, subunidades proteicas ou toxinas para indução da resposta imunológica. Já as vacinas de nova geração aumentam a segurança por eliminar vírus inteiros da sua composição, optando por subunidades de proteínas, DNA ou partículas semelhantes a vírus (VLPs) (Fuenmayor; Godia; Cervera, 2017), (Tabela 1).

Vacinas atenuadas: o passo crucial envolve a distinção entre a parte do vírus que causa a doença e a parte que é responsável pela imunização (Fuenmayor; Godia; Cervera, 2017). Nessas vacinas, o vírus é inativado por métodos químicos ou por exposição a altas temperaturas, o que impede sua capacidade de replicação. A inativação química envolve o uso de substâncias como formalina, β -mercaptoetanol

ou outros produtos químicos similares. Às vezes há necessidade de usar surfactantes (exemplo, triton-100) como processo adicional para a separação do vírus. A presença do surfactante induz a divisão do vírus, dilui sua membrana e expõe regiões virais internas (Kayser; Ramzan, 2021). As vantagens incluem metodologias bem desenvolvidas, políticas de regulamentação bem estabelecidas e instalações de fabricação existentes. Suas desvantagens incluem risco de reversão patogênica, fabricação mais lenta, tecnologia com alta mão de obra, controle de qualidade rigoroso, limitações com a estabilidade pela sensibilidade do vírus, que requer uma cadeia de frio precisa e contínua, assim, a soma desses fatores aumentam significativamente os custos (Cid; Bolívar, 2021).

Vacinas inativadas: são os tipos de vacinas mais difundidos. Conhecidas como vacinas mortas, elas têm o patógeno inativo por produtos químicos, calor ou radiação. Por não poderem se replicar, são tidas como mais seguras em relação às vacinas atenuadas, pois impedem a capacidade de replicação e a ocorrência de mutações funcionais que podem levar a reversão da virulência. Estas vacinas geram uma ampla resposta imune contra múltiplos alvos, uma vez que todo o patógeno é utilizado para a imunização. Por vezes geram uma resposta imunológica mais fraca, sendo necessárias doses adicionais ou de reforços para manter a proteção dos indivíduos (Delves, 2018).

Vacinas toxóides: são vacinas criadas a partir da inativação de toxinas produzidas e liberadas por bactérias. Elas provocam uma resposta imunológica contra o agente causador da doença, mas não contra o patógeno em si. Suas principais vantagens são sua notável estabilidade, longo prazo de armazenamento e segurança. Por sua vez, as particularidades incluem: múltiplas administrações, imunogenicidade relativamente baixa e emprego de adjuvantes na sua composição, a exemplo dos sais de alumínio (Ghattas *et al.*, 2021)

Vacinas conjugadas polissacarídeo: um grupo de polissacarídeo específico da superfície bacteriana é conjugado covalentemente a uma toxina modificada quimicamente. A toxina deixa de ser patogênica, porém se mantém antigênica. O acoplamento do açúcar à proteína nessas vacinas gera uma resposta imunológica duradoura com formação de células de memória e ativação de células B (Eiben *et al.*, 2019). A combinação dos dois componentes é necessária uma vez que os polissacarídeos são fracamente imunogênicos, enquanto os toxóides apresentam boa

imunogenicidade e efeitos colaterais baixos (Fernandes *et al.*, 2021). Vacinas toxóides conjugadas foram desenvolvidas contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) e pneumococo, difteria e tétano.

Vacinas subunidades: contêm proteínas isoladas do vírus sem a presença do ácido nucleico viral. São compostas por proteínas virais recombinantes ou proteínas purificadas do vírus selvagem, que atuam como antígenos (Fuenmayor; Godia; Cervera, 2017). Essas vacinas estimulam o organismo a reconhecer antígenos, sem expor ele ao risco de infecção causada pela replicação viral. Diversas vacinas contra a influenza são formuladas como vacinas de subunidade, há também vacinas contra a coqueluche, hepatite A, hepatite B, febre tifoide, entre outras.

Ácidos nucleicos: essas vacinas utilizam DNA ou RNA como antígeno, retirando uma pequena porção de um vírus, que pode ser uma proteína de superfície, por exemplo. O DNA ou RNA então é captado e traduzido em proteína pela célula hospedeira. No caso do RNAm, um sistema de entrega encapsulante deve ser utilizado, uma vez que o RNA tem alta instabilidade e curto tempo de vida no organismo (Kayser; Ramzan, 2021). Já as vacinas de DNA administram diretamente o receptor de um DNA plasmídico que codifica uma proteína antigênica que é expressa pelas células do receptor, desencadeando uma resposta imunológica (Tariq *et al.*, 2022). As vacinas contra a covid-19 das empresas farmacêuticas Pfizer/BioNTech, Moderna são os principais representantes dessa classe.

Como vantagem, por não possuir revestimento viral, os ácidos nucleicos não ficam vulneráveis a reações neutralizantes dos anticorpos, além do mais, a falta desse envoltório exclui o risco de a resposta imunológica ao revestimento ser superior a resposta imune ao produto transgene (Ghattas *et al.*, 2021).

Quadro 1 - Diferentes tipos de vacinas.

Tipo de vacina	Ilustração dos vetores	Vacinas licenciadas usando esta tecnologia	Ano de introdução
Viva atenuada (enfraquecida ou inativada)		Sarampo, caxumba, rubéola, febre amarela, influenza, poliomielite oral, febre tifóide, encefalite japonesa, rotavírus, BCG, varicela zoster.	1798 (varíola)
Organismo inteiro morto		Coqueluche de células inteiras, poliomielite, influenza, encefalite japonesa, hepatite A, raiva.	1896 (tifóide)
Toxóide		Difteria, tétano.	1923 (difteria)
Subunidade (proteína purificada, proteína recombinante, polissacarídeo, polipeptídeo)		Coqueluche, influenza, hepatite B, hepatite A meningocócica, pneumocócica, febre tifóide.	1970 (antraz)
Partícula assemelhada a vírus (VLP)		Papilomavírus humano (HPV)	1986 (hepatite B)
Vesícula de membrana externa		Meningocócica Grupo B	1987 (Meningocócica Grupo B)
Conjugado proteína-polissacarídeo		Haemophilus influenzae tipo B, pneumocócico, meningocócica, tifóide.	1987 (influenza tipo B)
Vetor Viral		Ebola	2019 (Ebola)
Vacina de ácido nucleico		SAS-CoV-2	2020 (SAS-CoV-2)
Vetor bacteriano		Experimental	-
Célula apresentadora de antígeno.		Experimental	-

Fonte: extraído e adaptado de Pollard e Bijker, 2020.

As vacinas convencionais foram responsáveis pelo controle de diversas doenças no mundo, vacinas atenuadas, por exemplo, marcaram o início da primeira era da vacinologia, foi esse tipo de vacina que erradicou a varíola e controlou os casos de sarampo no mundo.

As tradicionais vacinas usam metodologias bem desenvolvidas, fábricas de instalações delineadas e políticas de regulamentação bem estabelecidas e embora ainda sejam amplamente difundidas, existe o risco potencial da reversão para a forma patogênica no caso das formulações vivas atenuadas e imunogenicidade baixa relacionada as vacinas inativadas (Moradi *et al.*, 2021). Além disso, há riscos na produção de volumes elevados de patógenos, nas instalações de contenção e risco notável para operadores e o meio ambiente devido à natureza infecciosa do material, fatores que elevam significativamente os custos de fabricação. Outras limitações são o tempo de fabricação que demanda longos períodos até a etapa de envase e a cadeia de frio que é rigorosa e contínua devido a sensibilidade do vírus (D'Amico *et al.*, 2021).

Todavia, com os avanços na engenharia genética muitas metodologias estão sendo aperfeiçoadas e criadas. Sistemas tradicionais utilizando bactérias e leveduras foram refinados por meio da engenharia e novos sistemas baseados em plantas e outros hospedeiros surgiram como alternativas de baixo custo (Cid; Bolívar, 2021).

Estratégias inovadoras para a concepção de imunógenos e engenharia genética (incluindo tecnologias de DNA recombinante) favoreceram o surgimento das vacinas de última geração responsáveis por uma resposta imunológica mais potente. Vacinas de nova geração se tornam mais seguras por remover vírus inteiros da sua formulação e como alternativas, usam subunidades de proteínas, partículas semelhantes a vírus (VLPs) ou DNA na sua composição (Fuenmayor; Godia; Cervera, 2017).

Outro fator limitante é o tempo de adaptação às culturas de ovos ou leveduras, que retarda a resposta imunológica e nos casos de surtos ou pandemia tornam essas vacinas inadequadas (Duarte, 2016). Desta forma, segurança e alta produção são os quesitos de destaque para as vacinas de nova geração em comparação às vacinas de organismos inteiros, porém, estratégias são estudadas e aperfeiçoadas para que essas vacinas também sejam imuno estimulantes potentes (Su *et al.*, 2021).

4.2 VLPS: conceitualização

A nanotecnologia tem desempenhado papel significativo no avanço do desenvolvimento de vacinas, essa área trabalha com materiais variados e úteis que geram sistemas eficazes para a exibição de antígenos. As estruturas empregadas são organizadas em escalas de 1-100 nanômetros e produzidas por expressão recombinantes ou síntese química (Cid; Bolívar, 2021). Abordagens biológicas eficazes para geração de antígenos e sistemas de exibição incluem o uso de lipossomas, vesículas de membrana externa, partículas semelhantes a vírus (VLPs), sendo essa última foco de interesse desta revisão.

Partículas semelhantes a vírus (VLPs) se assemelham a estrutura externa, composição e tamanho de vírus nativos, porém, não apresentam material genético, o que faz dessas estruturas compostos não infecciosos. As VLPs preservam a antigenicidade nativa dos vírus que elas imitam, e com isso, são capazes de provocar resposta imune celular e humoral eficientes. Essas partículas se formam a partir de proteínas estruturais que pertencem a um tipo ou vários tipos de vírus. Quando compostas por proteínas estruturais ou epítomos imunogênicos de vírus distintos, são denominadas de VLPs quiméricas (Zahmanova *et al.*, 2022). Essas VLPs podem ser utilizadas como moduladores imunológicos ou auto adjuvantes para induzir potentes respostas imunes contra epítomos imunogênicos apresentados (Zahmanova *et al.*, 2022). Plataformas bem relatadas baseadas em proteínas de automontagem que atuam como transportadores incluem HPV L1, núcleo da hepatite B e antígenos de superfície (Cid; Bolívar, 2021).

De acordo com Nooraei *et al.* (2021), VLPs também podem ser não-envelopadas ou envelopadas. VLPs não-envelopadas são estruturas compostas por uma única ou múltiplas proteínas capsídeas, podendo ser produzidas em sistemas eucarióticos ou procarióticos. Já as VLPs envelopadas possuem uma membrana lipídica externa, adquirida durante o processo de montagem e brotamento das VLPs a partir da membrana celular do hospedeiro. Elas ainda podem apresentar uma ou mais âncoras de glicoproteína na membrana, que são os principais alvos do sistema imunológico para a produção de anticorpos neutralizantes.

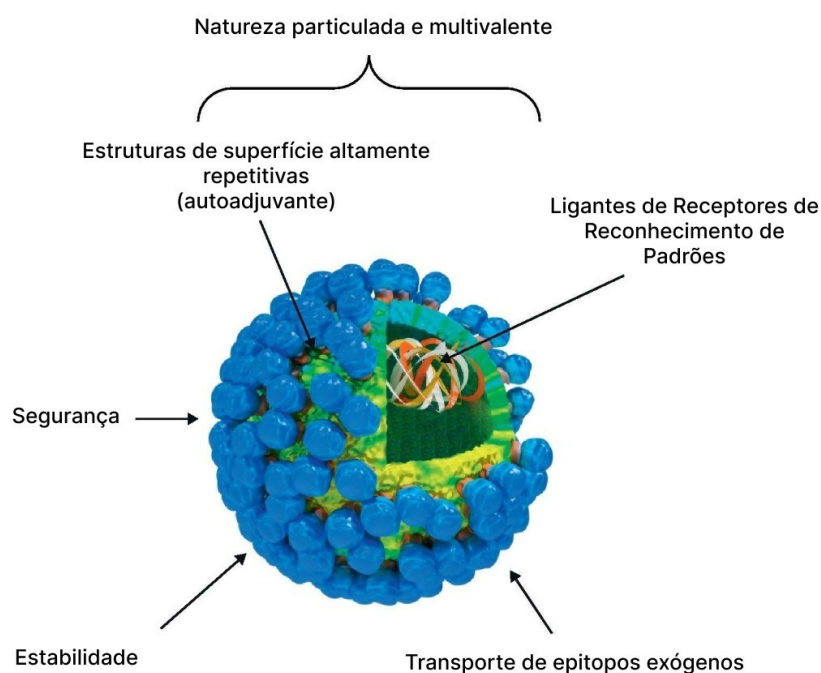
VLPs são consideradas vacinas recombinantes devido a modificação genética que sofrem, onde genes de interesse são inseridos ou manipulados em um organismo

para expressar proteínas específicas. No contexto de vacinas VLP, os genes virais relevantes são inseridos em células hospedeiras como plantas para induzir a expressão das proteínas virais e, conseqüentemente, formar as partículas semelhantes a vírus. A automontagem do capsídeo viral nas VLPs é feita por tecnologia recombinante para gerar as partículas com propriedades antigênicas de seus vírus autênticos (Caiado, 2017).

Vacinas VLPs foram desenvolvidas pela primeira vez no início da década de 1980 com a montagem de VLPs do vírus B da hepatite (HBV) no sistema de expressão de leveduras (Moradi *et al.*, 2021), alguns desses tipos de vacinas disponíveis incluem vacinas contra a influenza e contra hepatite A.

Vacinas baseadas em VLPs possuem todas as características das vacinas tradicionais, elas interagem e são absorvidas pelas células dendríticas (DCs) que por sua vez, processam e apresentam milhares de epítomos para moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I/II de uma única VLP, induzindo uma resposta imunológica rápida e potente mediada por células T sem a capacidade de causar doenças (Roldão *et al.* 2010; Hemmati *et al.*, 2022). Essa atuação é devido à sua semelhança com o vírus nativo em termos de tamanho, forma e matriz repetitiva de epítomos imunogênicos exibidos na superfície das VLPs (Moradi *et al.*, 2021). VLPs são consideradas seguras, altamente imunogênicas e representam uma abordagem promissora para vacinas.

Figura 1 - Características imunogênicas de VLPs apresentadoras de antígenos.



Fonte: Extraído e adaptado de Crisci; Bárcena; Montoya, 2013.

Uma das principais vantagens das VLPs são os seus sistemas repetitivos de exibição de antígenos responsáveis por aumentar os títulos de anticorpos quando os antígenos são exibidos continuamente pela ampliação de reticulação dos receptores de células B, e posteriormente, ativação de células B. Além disso, por possuir propriedades auto adjuvantes devido a sua particular estrutura e tamanho ideal, as VLPs são processadas eficientemente pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), causando à ativação de células T e tornando-se uma ferramenta interessante para elevação da imunogenicidade dos antígenos (Cid; Bolívar, 2021). As VLPs por si só podem ser antígenos, o que significa que a proteína que se agrupa na VLP é o antígeno de interesse. Esse é o caso das vacinas VLP, como HBV, HPV, PCV2 ou PPV. VLPs são geralmente produzidas em sistemas de expressão de células de bactérias, leveduras, insetos e plantas, cada plataforma de produção conta com vantagens e limitações (Hemmati *et al.*, 2022).

A expressão de grandes antígenos geneticamente fundidos ainda é um processo desafiador, designs de ligantes, titulação de antígeno e estratégia de fusão

de núcleos são estratégias implementadas para facilitar a modularização fácil de antígenos grandes (Cid; Bolívar, 2021).

4.3 Plantas

As exigências de plataformas econômicas para a produção de vacinas levaram ao surgimento de sistemas alternativos como as plantas. Há mais de 30 anos plantas são utilizadas para a produção de vacinas e medicamentos recombinantes, sendo esse processo descrito pelo termo de “agricultura molecular”. A agricultura molecular consiste na síntese de proteínas recombinantes desejáveis, como proteínas farmacêuticas e industriais, utilizando plantas inteiras ou tecidos/células vegetais cultivados em biorreatores de grande escala (Mahmood; Nasir; Hefferon, 2020).

Desde a descoberta dos vírus de plantas no final do século XIX, o seu impacto tem se transformado de patógenos prejudiciais para máquinas moleculares úteis com aplicações em agricultura molecular de plantas (PMF) e bionanotecnologia. Embora a percepção pública comumente associe os "vírus" a danos, essas entidades podem ser facilmente reconfiguradas em estruturas úteis e seguras (Zahmanova *et al.*, 2023). O aprofundamento do conhecimento sobre os genomas virais, sua arquitetura e propriedades biofísicas possibilitou a utilização de plantas virais como vetores para a expressão de proteínas recombinantes.

Várias espécies de plantas têm sido empregadas na produção de vacinas VLPs, sendo exemplos delas: tabaco, milho, batata, tomate, cenoura e alface. Contudo, a variedade de espécies não é somente a forma de diversidade inerente ao uso de vegetais para a produção de vacinas recombinantes. Além de distintas espécies, também foram exploradas múltiplas estratégias de transferência e expressão de genes.

As plantas apresentam uma série de benefícios como plataforma de produção, destacando-se pela modificação e montagem eficaz de proteínas eucarióticas, segurança aprimorada, custos reduzidos, grande escalabilidade e rápida velocidade de produção. Este último aspecto é particularmente crucial para o controle eficiente de surtos em potenciais pandemias (Hemmati *et al.*, 2022).

As vantagens mais significativas do emprego de plantas como biofábricas incluem sua facilidade de cultivo (demanda apenas de minerais e dióxido de carbono), pouco consumo de água, custos reduzidos de armazenamento, adaptação à cultura celular e controle de contaminação eficaz (Fahad *et al.*, 2014). É importante salientar que as plantas possuem uma maquinaria de síntese de proteínas semelhante à dos humanos, o que viabiliza a produção de proteínas complexas (Yusibov; Kushnir; Streatfield, 2014).

Outro aspecto relevante é que o desenvolvimento de vacinas à base de plantas destaca-se como uma importante estratégia para o controle de doenças tropicais negligenciadas. Essas vacinas podem oferecer formulações economicamente acessíveis, visando combater doenças que predominantemente impactam os países emergentes. O uso dessas plataformas elimina a necessidade de biorreatores e meios de cultura caros, reduzindo os requisitos de fabricação. Porém, Citiulo e colaboradores (2021) descrevem que muitas vezes vacinas VLP's vegetais precisam passar por processos de purificação devido a contaminantes e impurezas (expressão das proteínas recombinantes em plantas pode ter resíduos celulares, proteínas hospedeiras ou outros componentes não desejados).

A presença dessas impurezas pode afetar a segurança e eficácia da vacina, sendo uma exigência dos órgãos regulatórios que as vacinas vegetais atendam a critérios específicos de pureza e segurança antes de serem aprovadas para uso (Citiulo *et al.*, 2021). Outra limitação são os eventos epigenéticos imprevisíveis na expressão transgênica e o potencial de propagação de transgenes de algumas culturas através de cruzamento (Yusibov; Rabindran, 2008). Este último aspecto tem representado um desafio significativo para a aceitação regulatória e pública. No entanto, em certa medida, esse problema tem sido resolvido pelo cultivo de plantas transgênicas em confinamento.

Além do mais, alcançar uma expressão de alto rendimento de proteínas complexas ainda representa um desafio. A utilização abrangente de plantas inteiras e células vegetais na expressão de proteínas terapêuticas tem sido explorada, destacando-se a comercialização de uma enzima glucocerebrosidase humana recombinante produzida em células de cenoura (Cid; Bolívar, 2021).

Nicotiana benthamiana

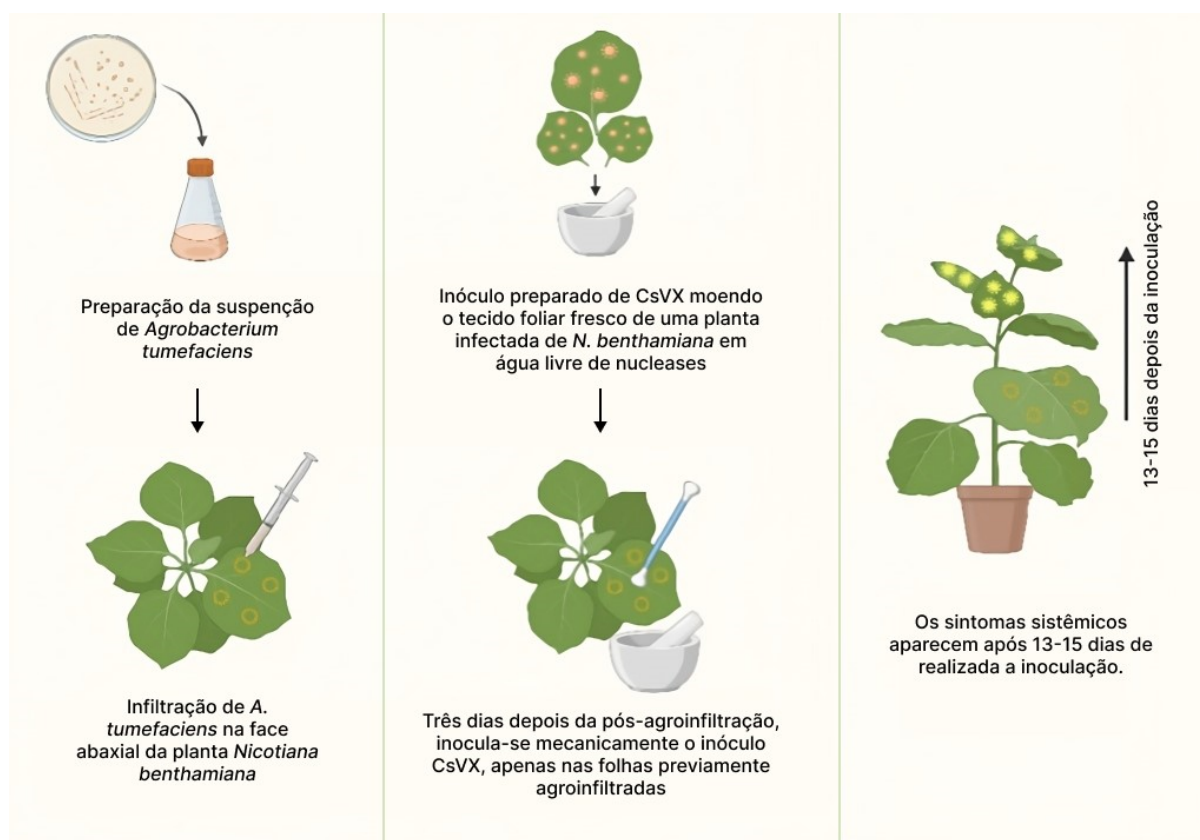
A planta *Nicotiana benthamiana*, conhecida popularmente como tabaco, é a espécie vegetal mais empregada na produção de vacinas à base de plantas e o hospedeiro mais utilizado no sistema de expressão transitória, devido ao seu rápido crescimento e por ser suscetível a agroinfiltração (Conley *et al.*, 2010).

A *N. benthamiana* é considerada a ideal nos sistemas de expressão de plantas devido à sua acessibilidade de obtenção, custo e manutenção. É uma espécie com potencial na engenharia genética por se adaptar facilmente aos meios, com rápida produção e elevado rendimento, tornando-se uma planta acessível para os centros responsáveis pela investigação dessa tecnologia (Yusibov; Kushnir; Streatfield, 2014). Além do mais, por não ser uma planta comestível, a entrada de proteínas recombinantes por cadeias alimentares é eliminada.

As plantas dessa espécie são sujeitadas a técnica de hidroponia, caracterizado por cultivo sob condições constantes e com propagação em estacas. A parte da planta a ser utilizada são as folhas, o que evita a fase de floração e, conseqüentemente, a fuga de genes através do pólen (Yusibov; Kushnir; Streatfield, 2014). Por não produzir pólen viável, os perigos com a bio contaminação são eliminados.

A principal desvantagem de usar essa planta como biorreator de vacinas é a presença da piridina, um alcaloide tóxico que interfere na aplicação direta do extrato vegetal bruto. Para superar esse problema, cruzaram-se duas linhagens transgênicas de *Nicotiana* através da engenharia genética, como produto final há formação de *Nicotiana* híbrida interespecífica, isenta de alcaloides na sua composição (Redkiewicz *et al.*, 2014).

Figura 2 - Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* e inoculação mecânica em *Nicotiana benthamiana*.



a. Preparação de suspensão de *A. tumefaciens* e infiltração nas folhas. b. Preparação do inóculo CsVX e inoculação mecânica. c. Sintomas sistêmicos em folhas novas.

Fonte: (Jimenez; Leiva; Cuellar, 2023).

As principais expressões de plantas seguem quatro etapas:

Escolha da planta hospedeira: Seleciona a planta hospedeira de acordo com as características de interesse. Normalmente, são usadas plantas de tabaco não comestíveis das espécies *Nicotiana benthamiana* e *Nicotiana tabacum*.

Escolha do vetor: Utilizam-se vetores de dois tipos, a bactéria *A. tumefaciens* que causa tumores em vegetais e possui elevada transferência de DNA em plantas ou vetores de vírus de plantas que comumente são entregues pela própria *A. tumefaciens*.

Transfecção de plantas: As plantas são transfectadas por inoculação mecânica, agroinfiltração ou infiltração a vácuo. Na inoculação mecânica há inoculação da *A. tumefaciens* na superfície do tecido vegetal ou inoculação de plasmídeos linearizados na parede celular da planta. Na agroinfiltração o vetor é

infiltrado na parte inferior (face abaxial) das folhas da planta, utilizando uma seringa para fazer um pequeno corte na epiderme do vegetal. Já na infiltração a vácuo, forma um vácuo para permitir a penetração dos vetores pelos espaços de ar de toda a planta (Chung *et al.*, 2021).

Purificação da proteína alvo: Essa é a parte que finaliza o processo de expressão. O tecido vegetal e paredes celulares são fragmentados para liberação de proteínas de interesse. Depois realiza-se a separação dessas proteínas dos demais componentes homogeneizados da planta, utilizando métodos de separação sólido-líquido (filtração por membrana ou centrifugação) (Chung *et al.*, 2021). Por fim, é realizada a purificação da solução por determinados tipos de cromatografia em diversas etapas.

4.4 Sistemas de expressão

Os atuais sistemas de expressão em plantas permitem a produção de grandes quantidades de proteína recombinante com modificações pós-traducionais, favorecendo a montagem de VLP de baixo custo e com baixo risco de introdução de patógenos humanos estranhos.

As primeiras tentativas de produção de VLP em plantas tiveram várias desvantagens, incluindo baixos rendimentos e um processo de produção muito lento envolvendo a produção de plantas transgênicas estáveis. O recente desenvolvimento de sistemas de expressão transitória baseados em vírus de plantas aumentaram muito a velocidade e o rendimento da produção de VLP (Hemmati *et al.*, 2022).

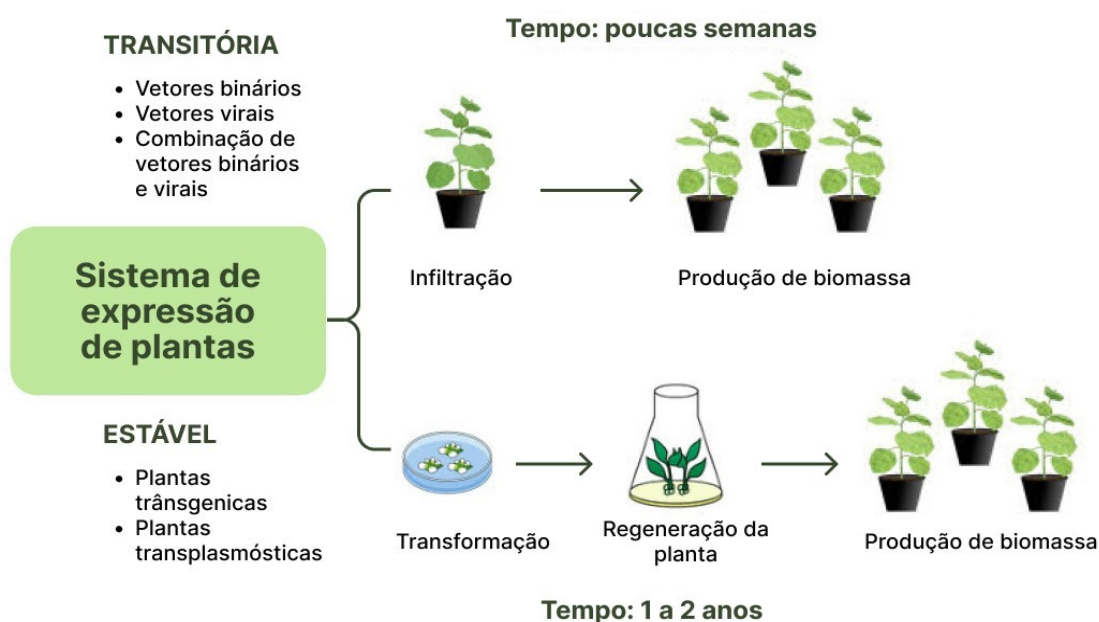
As proteínas recombinantes podem ser produzidas em plantas transgênicas estáveis por meio da expressão em culturas de células vegetais e por expressão transitória empregando vírus de plantas modificadas ou *Agrobacterium tumefaciens* (Chung *et al.*, 2021).

Vacinas produzidas em plantas envolvem a expressão de proteínas virais que desencadeiam resposta imunológica em vários sistemas vegetais. Porém, o método escolhido depende de características específicas da vacina e da planta.

As plataformas de expressão baseadas em plantas são divididas em três categorias: sistemas de expressão transitória, expressão estável nuclear de plantas

transgênicas ou culturas de células e expressão estável no genoma plastidial (cloroplasto) das chamadas plantas transplastômicas (Su *et al.*, 2023). Porém, os sistemas tradicionais e mais empregados em pesquisas são os sistemas de expressão estável e transitório.

Figura 3 - Principais sistemas de expressão em plantas.



Fonte: Adaptado de Redkiewicz *et al.*, 2014.

4.4.1 Expressão estável

Escalante *et al.* (2022) cita que esse método, desenvolvido há cerca de quatro décadas, consiste na clonagem de um pedaço de DNA contendo as instruções para a produção de uma proteína, que é inserido em plasmídeos (ex: pBI121 e pCambia). Esses plasmídeos são então introduzidos em bactérias *Agrobacterium tumefaciens* (principal espécie utilizada), que por sua vez, quando entram em contato com as plantas, transferem o DNA para elas. Posteriormente, as plantas transgênicas são cultivadas a partir dessas células. Para induzir a produção das proteínas desejadas nas plantas, são utilizados "interruptores" especiais chamados promotores, que podem ser ativados por diferentes substâncias ou condições físicas, como álcool, sal, temperatura ou luz. Também é possível adicionar fragmentos de vírus ao DNA para

aumentar a quantidade de proteínas produzidas. Segundo Fahad *et al.* (2015), nesse processo pode ocorrer interação e silenciamento de genes, além de chances por contaminação transgênica.

Inicialmente, *Nicotiana tabacum* era comum na produção de vacinas que utilizam esse método, porém, outras plantas como alface e cenoura estão sendo consideradas, especialmente para vacinas orais (Escalante *et al.*, 2022).

Segundo Redkiewicz, *et al.* (2014), as plantas transformadas de maneira estável oferecem a vantagem de produzir proteínas heterólogas de forma hereditária, permitindo aumento simples de escala. No entanto, o processo de obtenção de transformantes estáveis é demorado, geralmente levando de 1 a 2 anos, e frequentemente a produção de proteínas recombinantes pode ser inferior ao esperado.

Para alcançar altos níveis de expressão, são empregados cassetes de expressão com promotores robustos e elementos reguladores que melhoram tanto a transcrição quanto a tradução. Um exemplo é o sistema Impact vector™ desenvolvido pela Plant Research International da Universidade e Centro de Pesquisa de Wageningen – Holanda, que utiliza promotores rubisco (principal enzima do processo de fotossíntese) altamente eficientes e sensíveis à luz. Esses vetores permitem direcionar as proteínas recombinantes para diferentes compartimentos subcelulares, e a adição de um polipeptídeo semelhante à elastina (ELP) é considerada para aumentar o rendimento e a purificação das proteínas (Redkiewicz, *et al.*, 2014).

4.4.2 Expressão transitória

A expressão nuclear transitória é uma abordagem usada quando células vegetais transformadas precisam ser mantidas por um curto período, geralmente de dois a 10 dias. Nesse método, muitas cópias de genes são entregues ao núcleo, resultando em alta produção de proteínas recombinantes (Escalante *et al.*, 2022).

A expressão transitória foi desenvolvida como um atalho para a produção de vacinas e outras proteínas em plantas, devido a sua flexibilidade e rapidez na produção de elevadas quantidades de proteínas recombinantes.

O sistema de expressão transitória é amplamente utilizado em espécies de plantas, como *Lactuca sativa*, *Nicotiana tabacum* e *Nicotiana benthamiana* para produção de proteínas recombinantes. A plataforma padrão da expressão transitória é a *N. benthamiana* com plantas cultivadas entre 4 e 6 semanas de idade usadas em combinação com a *Agrobacterium tumefaciens* (Shanmugaraj *et al.*, 2021).

Os genes de interesse se tornam expressos logo após 3 dias da infiltração nas células vegetais. Esse método permite a produção eficiente de vários antígenos virais automontados com altos níveis de expressão em vacinas recombinantes. A infiltração por vácuo no tecido foliar da planta é o método mais eficaz para produção em alta escala, levando a produção de miligramas de proteínas em poucas semanas. A principal vantagem para a produção industrial centra-se na ausência de equipamentos sofisticados, o que traz benefícios já que a expressão pode ser melhorada com técnicas de otimização (Fahad *et al.*, 2014).

Segundo Redkiewicz *et al.*, (2014), esses sistemas podem ser implementados de diversas formas: (i) infiltrando as plantas com *Agrobacterium* contendo um vetor binário, (ii) infectando as plantas com um vírus de planta modificado, ou (iii) combinando ambas as abordagens, usando tanto vetores virais quanto a expressão mediada por *Agrobacterium* (por exemplo, MagnICON® e sistema 'Vetor de lançamento'). Em comparação com a transformação estável, todas as variantes de sistemas de expressão transitória são consideravelmente mais rápidas (Redkiewicz *et al.* 2014).

Entre as variantes deste sistema podemos destacar quatro: sistema do vetor Launch, sistema MagnICON, cassete de expressão do gene plastocianina e série de vetor pEAQ.

Sistema de 'vetor de lançamento': Combina vetores virais de RNA de plantas e plasmídeos binários de *Agrobacterium*, permitindo a expressão rápida de genes alvo. Usado para produzir antígenos como a HA recombinante de diferentes cepas de influenza.

Sistema MagnICON®: Usa células de *Agrobacterium* para montar vetores virais funcionais dentro das células vegetais, combinando eficiência de *Agrobacterium* com alta velocidade e expressão de vetores virais. Utilizado para produzir vacinas contra o vírus da gripe H5N1 para aves.

Cassete de expressão do gene plastocianina de alfafa: Contém elementos reguladores e é usado para gerar VLPs recombinantes. Utilizado na produção de HA do H5N1 e H1N1 sazonal.

Vetores pEAQ: Baseados em RNA-2 do vírus do mosaico do feijão-caupi, permitem a produção eficiente de proteínas sem replicação viral. Projetados para produzir uma variedade de proteínas em sistemas transitórios e estáveis (Redkiewicz, *et al.* 2014).

O sistema magnICON® é um exemplo notável, desenvolvido a partir do RNA do vírus do mosaico do tabaco, permitindo expressão transitória em plantas. Diversos vetores virais estão disponíveis, como os baseados em potexvírus de bambu e geminivírus vegetais, usados para produzir proteínas biofarmacêuticas. O sucesso desses vetores depende de sua capacidade de escapar do sistema imunológico das plantas e replicar-se eficientemente nas células vegetais para produzir altos níveis de antígenos (Escalante *et al.*, 2022).

4.4.3 Expressão plastidial

A transformação do cloroplasto, pioneira na modificação genética de células verdes há cerca de três décadas, inicialmente empregou procedimentos biolísticos (método de transferência direta de genes em uma célula). Esses métodos consistem no revestimento de micropartículas de ouro ou tungstênio com material genético contendo unidades mínimas de expressão gênica, que então são atiradas nas células-alvo. Após inseridas na célula, as moléculas de DNA podem ser integradas ao genoma do cloroplasto por meio de mecanismos de recombinação de DNA. Além disso, outras organelas plastidiais, como os cromoplastos (plastídios em frutas) e os dos tubérculos, também foram utilizados para transformação (Escalante *et al.*, 2022). Duarte (2016) descreve que nesse método, a planta-filha produz os genes herdados pela planta-mãe que codificam uma proteína específica sem ocorrência de mecanismo de silenciamento de genes.

Atualmente, esse método apresenta determinadas vantagens, incluindo uma maior produção de proteínas recombinantes em comparação com a transformação nuclear estável. Isso se deve ao maior número de cópias dos genomas do cloroplasto presentes em uma planta (Escalante *et al.*, 2022). Su, *et al.*, (2023) descreve que o

sistema de expressão do cloroplasto tem potencial promissor para vacinas orais e cita estudos que indicaram que os cloroplastos da alface são capazes de expressar níveis elevados de antígenos para terapia oral em humanos.

Vale notar que o cloroplasto não possui a maquinaria necessária para modificar proteínas após a tradução. Essa limitação pode ser significativa, especialmente em casos em que a produção de vacinas requer proteínas modificadas pós-tradução (Escalante *et al.*, 2022).

Quadro 2 - Vantagens e desvantagens dos sistemas de expressão de plantas utilizados na produção de vacinas do tipo VLPs.

SISTEMAS DE EXPRESSÃO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
ESTÁVEL	- Expressão prolongada de proteínas; - Alta estabilidade genética; - Produção em larga escala (quando estabelecida uma linha transgênica estável); - Custo barato de armazenamento.	- Custo e tempo de produção (meses a anos em processo de transformação); - Risco de inativação do gene.
PLASTÍDIO	- Altos níveis de expressão; - Estabilidade muito alta; - Potencial cultivo por herança materna (características genéticas introduzidas no cloroplasto de uma planta transgênica serão transmitidas para as gerações futuras, seguindo o padrão de herança materna).	- Falta de pesquisas para aplicações comerciais; - Limitação na produção de vacinas (só algumas espécies de plantas são exploradas).

TRANSITÓRIO	- Rápida produção (expressão de proteínas, geralmente, em 48 horas); - Flexibilidade (múltiplos genes podem ser expressos em uma única planta); - Alta escalabilidade (rendimentos proteicos elevados); - Vetores bacterianos e virais facilmente manipulados; - Baixo custo inicial; - Adaptação a várias espécies de plantas (o sistema transitório é empregado em várias espécies de vegetais).	- Estabilidade limitada (a expressão de proteínas recombinantes é temporária e pode diminuir rapidamente); - A purificação é necessária; - Alteração na produção de proteínas recombinantes por diferentes fatores.
---------------------------	---	---

Fonte: Adaptado de Moon *et al.*, 2019.

4.5 Mercado e testes clínicos

Em 2006 a primeira vacina veterinária de partículas semelhantes a vírus (VLPs) produzida no sistema transitório de *N. bethamiana* foi aprovada pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos para uso comercial contra o vírus da doença de Newcastle (NDV), que afeta galinhas (Vermij; Waltz, 2006).

Embora a descoberta de que vacinas poderiam ser produzidas através de plataformas vegetais tenha se materializado cedo, o desenvolvimento da produção de vacinas em plantas tem sido lento e nenhuma vacina humana produzida em plantas foi licenciada até a data. O conceito sofreu um declínio devido à falta de estruturas regulatórias e um histórico não comprovado na indústria (Fischer; Buyel, 2020).

A maioria das pesquisas iniciais sobre vacinas VLPs de plantas focaram na aprimoração da expressão, no aumento da produção e desenvolvimento de métodos

de purificação, em vez de direcionar esforços para a competitividade de mercado, uma vez que os ensaios clínicos são desafiadores e estão repletos de rigorosas regulamentações (Schillberg *et al.*, 2019).

Entretanto, com o decorrer do tempo, a padronização de procedimentos, a criação de instalações de produção vegetal em conformidade com as Boas Práticas de Fabricação (BPF), a formulação de regulamentações específicas, bem como, as análises técnico-econômicas evidenciaram que a produção comercial de vacinas de partículas semelhantes a vírus (VLPs) em plantas tem se tornado uma alternativa mais amplamente aceita e viável (Fischer; Buyel, 2020).

A Medicago Inc. (EUA e Canadá) desenvolveu a primeira vacina VLP contra a COVID-19 destinada ao uso humano, denominada CoVLP, produzida em plantas. Oficialmente aprovada em fevereiro de 2022 pelo Health Canada, após resultados positivos nos ensaios clínicos de fase III conduzidos por Hager *et al.* (2022), a vacina, registrada como COVIFENZ © (NCT04636697), foi avaliada quanto à imunogenicidade, segurança e eficácia da formulação e do regime de dosagem.

O estudo mostrou que a vacina teve eficácia de 78,8% nos participantes com doenças moderadas a graves e 74% de eficácia em pacientes soronegativos para a doença. Adicionalmente, a vacina mostrou 69,5% de eficácia contra a COVID-19 causada por cinco variantes distintas, incluindo delta, gama, alfa, lambda e mu. Contudo, em março de 2022, a Organização Mundial da Saúde rejeitou a vacina devido à participação da empresa de tabaco Philip Morris International na Medicago (Stander; Mbewana; Meyers, 2022). Já em fevereiro de 2023, a Mitsubishi anunciou o encerramento da Medicago, resultando na retirada dos produtos Medicago do mercado e marcando o fim da CoVLP/Covifenz ©. A Mitsubishi alegou que a vacina já não era comercialmente viável, devido à diminuição da demanda e à presença consolidada de outras vacinas no cenário global.

A Medicago Inc. também desenvolveu avanços na área de VLP's à base de plantas, com uma vacina dessa plataforma contra influenza sazonal H5N1 e H1N1 (Govea-Alonso; Rybicki; Rosales-Mendoza, 2014).

Antes da COVID-19, a vacina contra a gripe desenvolvida pela Medicago Inc. (Quebec, Canadá), destacava-se como a principal candidata para impulsionar a presença das vacinas produzidas em plantas no cenário comercial. Em 2008, D'Aoust *et al.*, demonstraram que a expressão individual da proteína HA de duas cepas (H5/N1

e H1/N1) da influenza A foi expressa transitoriamente em plantas do tipo *N. benthamiana*, montada em VLP.

Em 2020, a vacina VLP quadrivalente contra a influenza completou os ensaios clínicos de fase 3, destacando-se como vacinas humanas derivadas de plantas em estágios clínicos finais. Este avanço foi caracterizado pela sua excelente tolerância e pela capacidade de proporcionar uma proteção substancial contra o vírus influenza em adultos (Citiulo, 2021).

Por fim, é interessante destacar que a primeira vacina candidata humana do tipo VLP foi produzida e expressa em plantas de tabaco transgênico (*N. tabacum*) para combater o vírus da hepatite B (HBV). A expressão de antígenos de superfície do VHB (HBsAg), acarretou a montagem de partículas semelhantes às que existem naturalmente no soro humano, mas produzidas de forma recombinante em plantas. Isso aponta para um potencial promissor na produção de vacinas vegetais. Porém, mesmo com produção bem-sucedida dessas partículas em batata e na alface, testes em ensaio clínico de fase I concluídos, produção de VLPs do HBV transitoriamente no tabaco e aumento nos níveis de expressão, a comercialização dessa vacina ainda não alcançou o mercado (Stander; Mbewana; Meyers, 2022).

Quadro 3 - Vacinas VLPs à base de plantas em estudos pré-clínicos.

Doença alvo	Antígeno	Tipo de vacina	Hospedeiro	Referências
Hepatite B	AgHBc	VLP	<i>N. benthamiana</i> e <i>L. sativa</i>	PYRSKI, M. <i>et al.</i> Parenteral–oral immunization with plant-derived HBcAg as a potential therapeutic vaccine against chronic hepatitis B. Vaccines , v. 7, n. 4, p. 211, 2019.
Hepatite E	HBcAg-ORF2 AA551-AA607	VLPs quiméricas	<i>N. benthamiana</i>	ZAHMANOVA, G. <i>et al.</i> Efficient production of chimeric hepatitis B virus-like particles bearing an epitope of hepatitis E virus capsid by transient expression in <i>Nicotiana benthamiana</i> . Life , v. 11, n. 1, p. 64, 2021.

Dengue	C-pRM-E + NSP truncado	VLPs	<i>N. benthamiana</i>	PONNDORF, D. <i>et al.</i> Plant-made dengue virus-like particles produced by co-expression of structural and non-structural proteins induce a humoral immune response in mice. Plant Biotechnology Journal , v. 19, n. 4, p. 745-756, 2021.
Dengue	HBcAg-DENV EDIII	VLPs de exibição de antígeno	<i>N. benthamiana</i>	PANG, E. L. <i>et al.</i> Epitope presentation of dengue viral envelope glycoprotein domain III on hepatitis B core protein virus-like particles produced in <i>Nicotiana benthamiana</i> . Frontiers in plant science , v. 10, p. 455, 2019.
Vírus do Nilo Ocidental (WNV)	Fago AP205-WNV EDIII	VLPs Exibição de antígeno	<i>N. benthamiana</i>	STANDER, J. <i>et al.</i> A plant-produced virus-like particle displaying envelope protein domain III elicits an immune response against west Nile virus in mice. Frontiers in Plant Science , v. 12, p. 738619, 2021.
Norovírus	Proteínas do capsídeo GI e GIII.4	VLPs	<i>N. benthamiana</i>	TUSÉ, D. <i>et al.</i> Safety and immunogenicity studies in animal models support clinical development of a bivalent norovirus-like particle vaccine produced in plants. Vaccine , v. 40, n. 7, p. 977-987, 2022.
Papilomavírus humano (HPV)	HPV-16 L1-L2	VLPs quiméricas	<i>N. benthamiana</i>	CHABEDA, A. <i>et al.</i> Substitution of human papillomavirus type 16 L2 neutralizing epitopes into L1 surface loops: the effect on virus-like particle assembly and immunogenicity. Frontiers in plant science , v. 10, p. 779, 2019.
Influenza	H5N1	VLP	<i>N. benthamiana</i>	MAJOR, D. <i>et al.</i> Intranasal vaccination with a plant-derived H5 HA vaccine protects mice and ferrets against highly pathogenic avian influenza virus challenge. Human vaccines & immunotherapeutics , v. 11, n. 5, p. 1235-1243, 2015.
Covid-19 (SARS-CoV-2)	Glicoproteína S1	VLP	<i>N. benthamiana</i>	MAMEDOV, T. <i>et al.</i> Engineering, production and characterization of Spike and Nucleocapsid structural proteins of SARS-CoV-2 in <i>Nicotiana benthamiana</i> as vaccine candidates against COVID-19. Biorxiv , 2020.

Covid-19 (SARS-CoV-2)	E, M e S1	VLPs	<i>N. benthamiana</i>	PEYRET, H. <i>et al.</i> Producing vaccines against enveloped viruses in plants: Making the impossible, difficult. Vaccines , v. 9, n. 7, p. 780, 2021.
Sincicial respiratório (VSR)	Proteína G	Vírus do mosaico da alfafa-VLP	<i>Nicotiana tabacum</i>	PLUMMER, E. M.; MANCHESTER, M. Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology , v. 3, n. 2, p. 174-196, 2011. e YUSIBOV, V. <i>et al.</i> Peptide-based candidate vaccine against respiratory syncytial virus. Vaccine , v. 23, n. 17-18, p. 2261-2265, 2005.
Ebola	Glicoproteína (GP1)	VLP Transitório	<i>Nicotiana benthamiana</i>	PHOOLCHAROEN, W. <i>et al.</i> Expression of an immunogenic Ebola immune complex in <i>Nicotiana benthamiana</i> . Plant biotechnology journal , v. 9, n. 7, p. 807-816, 2011.
Língua azul	VP3, VP7, VP5 e VP2 proteína	VLPs	<i>N. benthamiana</i>	THUENEMANN, E. C. <i>et al.</i> A method for rapid production of heteromultimeric protein complexes in plants: assembly of protective bluetongue virus-like particles. Plant biotechnology journal , v. 11, n. 7, p. 839-846, 2013.
Gastroenterite (Norwalk)	Proteína do capsídeo	VLP	Tomate	HUANG, Z. <i>et al.</i> Virus-like particle expression and assembly in plants: hepatitis B and Norwalk viruses. Vaccine , v. 23, n. 15, p. 1851-1858, 2005.

Fonte: extraído e adaptado de Maharjan; Choe, 2021 e Vahdat *et al.*, 2021.

A tabela 3 apresenta alguns exemplos de vacinas VLPs à base de plantas em estudos pré-clínicos. De acordo com Pang *et al.*, 2019, uma vacina experimental contra a dengue utilizou uma sequência consensual do domínio III da glicoproteína viral antigênica (cEDIII) para garantir uma proteção ampla contra os quatro sorotipos do vírus. Utilizando a tecnologia de núcleo em tandem (tandem core) da hepatite B, que consiste em repetir sequências de DNA ou proteínas em uma mesma região, a sequência cEDIII foi inserida em uma região chave da proteína do núcleo da hepatite B (HBcAg) para sua exibição nas estruturas de espículas das partículas montadas.

Durante o estudo, a estratégia explorada foi a utilização do antígeno do núcleo do vírus da hepatite B (HBcAg) para apresentar o epítipo cEDIII. As partículas centrais em tandem, que exibiam os epítipos cEDIII (tHBcAg-cEDIII), foram produzidas em *Nicotiana benthamiana* através de expressão transitória mediada por *Agrobacterium*. Essas partículas semelhantes a vírus (VLPs) tHBcAg-cEDIII foram visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão, apresentando diâmetros de 32 a 35 nanômetros (Pang *et al.*, 2019).

Os ratos imunizados com as VLPs tHBcAg-cEDIII mostraram uma resposta imunológica positiva para o antígeno cEDIII, indicando que as VLPs foram eficazes em apresentar o antígeno ao sistema imunológico (Pang *et al.*, 2019). Assim, os resultados demonstram que as VLPs tHBcAg-cEDIII têm potencial para serem desenvolvidas como uma vacina de custo-benefício favorável, capaz de conferir proteção simultânea contra os quatro sorotipos virais da dengue.

Um outro estudo que também foi exemplificado na tabela 3, utilizou o método chamado magnICON®. No qual, cientistas criaram duas versões de VLP's do Norovírus, cobrindo diferentes tipos virais. Essas versões, conhecidas como genótipos GI.4 e GII.4, foram combinadas em uma vacina bivalente chamada rNV-2v. Para o teste da sua segurança e eficácia, a vacina foi administrada em coelhos brancos na Nova Zelândia, tanto por via subcutânea (SC), quanto intramuscular (IM) (Tusé *et al.*, 2022).

Os resultados mostraram que a vacinação sem adjuvantes resulta em respostas imunes fortes e específicas para diferentes tipos de norovírus, independentemente das doses (200 a 400 µg VLP/administração) e esquemas de administração (dias 1 e 7; ou dias 1, 15 e 29). Houve relatos de irritação leve no local da injeção, mas que desapareceu com o tempo, como era esperado. Além disso, não foram encontrados sinais de toxicidade sistêmica nos testes realizados em relação à química sanguínea, contagem de células sanguíneas, peso dos órgãos ou exames de tecidos.

Nos testes com três doses, a dose segura (NOAEL) para a vacina rNV-2v foi de 200 µg. Uma versão melhorada da VLP GI.4, misturada com a VLP GII.4, foi testada em doses mais altas, aumentando a dose segura para 300 µg. Análises sanguíneas mostraram níveis significativos de anticorpos específicos contra as VLPs

da vacina rNV-2v, bem como, respostas relevantes de anticorpos bloqueadores de norovírus (Tusé *et al.*; 2022).

Esses resultados promissores colaboram com o avanço do uso de VLPs à base de plantas para testes clínicos, representando um passo importante no desenvolvimento de uma vacina contra o norovírus.

Quadro 4 - Vacinas VLPs à base de plantas em estudos clínicos de fases I, II ou III.

Doença alvo	Antígeno	Sistema de expressão e planta	Fase clínica	Referências
Influenza sazonal A/H1N1, A/H3N2	HA quadrivalente	VLP transitório <i>N. benthamiana</i>	Fase III concluída	WARD, B. J. <i>et al.</i> Efficacy, immunogenicity, and safety of a plant-derived, quadrivalent, virus-like particle influenza vaccine in adults (18–64 years) and older adults (≥ 65 years): Two multicentre, randomised phase 3 trials. The Lancet , v. 396, n. 10261, p. 1491-1503, 2020. e WARD, B. J. <i>et al.</i> Phase III: Randomized observer-blind trial to evaluate lot-to-lot consistency of a new plant-derived quadrivalent virus like particle influenza vaccine in adults 18–49 years of age. Vaccine , v. 39, n. 10, p. 1528-1533, 2021.
Covid-19 SARS-CoV-2	Proteína Spike	VLP Transitório <i>N. benthamiana</i>	Fase III	GOBEIL, P. <i>et al.</i> Interim report of a phase 2 randomized trial of a plant-produced virus-like particle vaccine for Covid-19 in healthy adults aged 18-64 and older adults aged 65 and older. MedRxiv , 2021. e MEDICAGO. Study of a Recombinant Coronavirus-Like Particle COVID-19 Vaccine in Adults. ClinicalTrials.gov . Jun. 2022. Disponível em: https://clinicaltrials.gov/study/NC04636697 . Acesso em: 20 jan. 2024.
Covid-19 SARS-CoV-2	RBD	VLP Transitório <i>N. benthamiana</i>	Fase I/II	KBIO INC. KBP-201 COVID-19 Vaccine Trial in Healthy Volunteers. ClinicalTrials.gov . Mar. 2023. Disponível em: https://clinicaltrials.gov/study/NC04473690 . Acesso em: 15 jan. 2024.

Gripe H5N1	AH (H5)	VLP Transitório <i>N. benthamiana</i>	Fase II concluída	PILLET, S. <i>et al.</i> Humoral and cell-mediated immune responses to H5N1 plant-made virus-like particle vaccine are differentially impacted by alum and GLA-SE adjuvants in a Phase 2 clinical trial. npj Vaccines , v. 3, n. 1, p. 3, 2018.
Gripe H5N1	HA	VLP Transitório <i>N. benthamiana</i>	Fase I concluída	CHICHESTER, J. A. <i>et al.</i> Safety and immunogenicity of a plant-produced recombinant hemagglutinin-based influenza vaccine (HA1-05) derived from A/Indonesia/05/2005 (H5N1) influenza virus: a phase 1 randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study in healthy adults. Viruses , v. 4, n. 11, p. 3227-3244, 2012.
Gripe subtipo H1N1	HA	VLP Transitório <i>N. benthamiana</i>	Fase I concluída	CUMMINGS, J. F. <i>et al.</i> Safety and immunogenicity of a plant-produced recombinant monomer hemagglutinin-based influenza vaccine derived from influenza A (H1N1) pdm09 virus: a Phase 1 dose-escalation study in healthy adults. Vaccine , v. 32, n. 19, p. 2251-2259, 2014.
Malária	Pfs25 (FhCMB)	VLP Transitório <i>N. benthamiana</i>	Fase I concluída	JONES, R. M. <i>et al.</i> A plant-produced Pfs25 VLP malaria vaccine candidate induces persistent transmission blocking antibodies against <i>Plasmodium falciparum</i> in immunized mice. PloS one , v. 8, n. 11, p. e79538, 2013. e CHICHESTER, J. A. <i>et al.</i> Safety and immunogenicity of a plant-produced Pfs25 virus-like particle as a transmission blocking vaccine against malaria: A Phase 1 dose-escalation study in healthy adults. Vaccine , v. 36, n. 39, p. 5865-5871, 2018.
Gripe H7N9	AH (H7)	VLP Transitório <i>N. benthamiana</i>	Fase I	TAKEYAMA, N.; KIYONO, H.; YUKI, Y. Plant-based vaccines for animals and humans: recent advances in technology and clinical trials. Therapeutic advances in vaccines , v. 3, n. 5-6, p. 139-154, 2015. e PILLET, S. <i>et al.</i> Plant-derived H7 VLP vaccine elicits protective immune response against H7N9 influenza virus in mice and ferrets. Vaccine , v. 33, n. 46, p. 6282-6289, 2015.

Cólera	CTB	Transgênico Arroz	Fase I	KASHIMA, K. <i>et al.</i> Good manufacturing practices production of a purification-free oral cholera vaccine expressed in transgenic rice plants. Plant cell reports , v. 35, p. 667-679, 2016.
Hepatite B	HBsAg	Transgênico Batata	Fase I	THANAVALA, Y. <i>et al.</i> Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. Proceedings of the National Academy of Sciences , v. 102, n. 9, p. 3378-3382, 2005.
Hepatite B	HBsAg	Transgênico Alface	Fase I	KAPUSTA, J. <i>et al.</i> A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. The FASEB journal , v. 13, n. 13, p. 1796-1799, 1999.
Raiva	Proteína G	VLP Transitório Espinafre	Fase I	YUSIBOV, V. <i>et al.</i> Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. Vaccine , v. 20, n. 25-26, p. 3155-3164, 2002.
Gastroenterite (Norwalk)	Proteína do capsídeo	Transgênico Batata	Fase I	TACKET, C. O. <i>et al.</i> Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. The journal of infectious diseases , v. 182, n. 1, p. 302-305, 2000.
Gastroenterite (Norwalk)	-	VLP Transitório <i>N. benthamiana</i>	Fase I	SAALE, H. Icon Genetics clinical development of its novel norovirus vaccine reaches milestone of complete dosing of the first cohort. Icon Genetics . Out. 2020. Disponível em: https://www.icongenetics.com/icon-genetics-clinical-development-of-its-novel-norovirus-vaccine-reaches-milestone-of-complete-dosing-of-the-first-cohort/ . Acesso em: 22 jan. 2024.
Antraz	PA83 (FhCMB)	VLP Transitório <i>N. benthamiana</i>	Fase I	FRAUNHOFER - CENTER FOR MOLECULAR BIOTECHNOLOGY. PA83-FhCMB Plant-Derived Recombinant Protective Antigen (rPA) Anthrax Vaccine. ClinicalTrials.gov . Dez. 2016. Disponível em: https://clinicaltrials.gov/study/NCT02239172 . Acesso em: 25 jan. 2024. e STANDER, J.; MBEWANA, S.; MEYERS, A. E. Plant-Derived Human Vaccines: Recent Developments. BioDrugs , v. 36, n. 5, p. 573-589, 2022.

Gastroenterite (Rotavírus)	G1	VLP Transitório <i>N. benthamiana</i>	Fase I	STANDER, J.; MBEWANA, S.; MEYERS, A. E. Plant-Derived Human Vaccines: Recent Developments. BioDrugs , v. 36, n. 5, p. 573-589. 2022.
Linfoma Folicular	Autólogo	- <i>N. benthamiana</i>	Fase I	TUSÉ, D. <i>et al.</i> Clinical Safety and Immunogenicity of Tumor-Targeted, Plant-Made Id-KLH Conjugate Vaccines for Follicular Lymphoma. Biomed Research International , 2015, 648143, 2015.
HIV	P2G12	- <i>N. benthamiana</i>	Fase I	JEFFERYS, R. The HIV Vaccines, Passive Immunization, and Antibody Gene Transfer Pipeline. Treatment Action Group . Jul. 2018. Disponível em: https://www.treatmentactiongroup.org/resources/pipeline-report/2018-pipeline-report/the-hiv-vaccines-passive-immunization-and-antibody-gene-transfer-pipeline/ . Acesso em: 21 jan. 2024.

Fonte: extraído e adaptado de Maharjan; Choe, 2021 e Vahdat *et al.*, 2021.

Exemplos de vacinas VLPs à base de plantas em estudos clínicos de fases I, II ou III são exemplificados na tabela 4. Ward *et al.* (2020) descreve dois estudos randomizados cegos multinacionais de eficácia de fase 3 que avaliaram uma vacina contra influenza recombinante de partículas semelhantes a vírus quadrivalentes (QVLP) fabricada em plantas. Um desses estudos incluiu adultos com idade entre 18 e 64 anos (o estudo de 18 a 64 anos), enquanto o outro envolveu idosos com 65 anos ou mais (o estudo com mais de 65 anos). Esses estudos foram conduzidos durante as temporadas de gripe de 2017-2018 (estudo de 18-64 anos) e 2018-2019 (estudo com mais de 65 anos).

No estudo de 18 a 64 anos, realizado em 73 locais do hemisfério norte, os critérios de inclusão foram índice de massa corporal inferior a 40 kg/m² e boa saúde. Já no estudo com mais de 65 anos, realizado em 104 locais na Ásia, Europa e América do Norte, os critérios de inclusão foram índice de massa corporal de no máximo 35 kg/m² e idade igual ou superior a 65 anos.

Os participantes do estudo de 18 a 64 anos foram designados aleatoriamente para receber a vacina QVLP (30 µg de hemaglutinina por cepa) ou placebo, enquanto os participantes do estudo com mais de 65 anos foram designados para receber a

vacina QVLP (30 µg de hemaglutinina por cepa) ou vacina comercial quadrivalente inativada (QIV; 15 µg de hemaglutinina por cepa). No estudo de 18 a 64 anos, 10.160 participantes foram designados aleatoriamente, dos quais 5.077 receberam a vacina QVLP e 5.083 receberam placebo. Já no estudo com mais de 65 anos, 12.794 participantes foram designados aleatoriamente, sendo 6.396 no grupo da vacina QVLP e 6.398 no grupo QIV (Ward *et al.*, 2020).

No estudo de 18 a 64 anos, o resultado primário foi a eficácia absoluta da vacina na prevenção de doenças respiratórias confirmadas em laboratório, enquanto no estudo com mais de 65 anos, o resultado primário foi a eficácia relativa da vacina na prevenção de doenças semelhantes à gripe. Já ao fim dos estudos, o de 18 a 64 anos não atingiu seu objetivo mínimo de 70% de eficácia absoluta da vacina QVLP (35,1% [intervalo de confiança - IC 95% 17,9 a 48,7]). Enquanto o estudo com pessoas acima dos 65 anos atingiu seu objetivo de não inferioridade com uma eficácia relativa da vacina QVLP para a prevenção de doenças semelhantes à gripe causadas por qualquer cepa de 8,8% (-16,7 a 28,7) (Ward *et al.*, 2020).

Esses estudos representam um dos primeiros estudos em grande escala de qualquer vacina humana derivada de plantas. Juntos, eles indicam que a vacina QVLP de origem vegetal pode oferecer proteção substancial contra doenças respiratórias e semelhantes à gripe causadas por vírus influenza em adultos, com boa tolerabilidade e sem sinais importantes de segurança.

Um outro estudo exemplificado na tabela 4, descreva as pesquisas de uma vacina experimental Pfs25 (*Plasmodium falciparum* surface de peso molecular 25) desenvolvida pelo Centro Fraunhofer de Biotecnologia Molecular dos Estados Unidos da América - FhCMB contra a malária. A vacina é uma partícula semelhante a vírus composta pela fusão da Pfs25 com a proteína de revestimento do vírus do mosaico da alfafa (Chichester *et al.*, 2018). Ela foi produzida em plantas de *Nicotiana benthamiana* para avaliar sua segurança, reatogenicidade e imunogenicidade em voluntários saudáveis.

O estudo envolveu 44 adultos divididos em quatro grupos, recebendo doses de 2µg, 10µg, 30µg e 100µg da vacina Pfs25 VLP-FhCMB com o adjuvante Alhydrogel® ((hidróxido de alumínio). As doses foram administradas em três etapas, nos dias 0, 56 e 168, e a segurança de cada dose foi avaliada antes de avançar para o nível de dose seguinte.

Os resultados mostraram que a vacina foi geralmente segura, sem eventos adversos graves relacionados à vacinação. Embora tenha induzido a produção de anticorpos específicos para a proteína Pfs25, a capacidade desses anticorpos em reduzir a transmissão do parasita da malária foi limitada, especialmente nas doses mais baixas. No entanto, a dose mais alta (100 µg) demonstrou uma resposta protetora significativa após a terceira dose, demonstrando o potencial dessa vacina como uma estratégia de imunização contra a malária.

Quadro 5 - Vacinas VLPs à base de plantas para epidemias em estudo pré-clínico.

Doença alvo	Antígeno	Planta	Sistema de expressão	Referências
Praga	F1 e V	<i>Nicotiana benthamiana</i>	VLP Transitório	CHICHESTER, J. A. <i>et al.</i> A single component two-valent LcrV-F1 vaccine protects non-human primates against pneumonic plague. Vaccine , v. 27, n. 25-26, p. 3471-3474, 2009.
Ebola	Glicoproteína (GP1)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	VLP Transitório	PHOOLCHAROEN, W. <i>et al.</i> Expression of an immunogenic Ebola immune complex in <i>Nicotiana benthamiana</i> . Plant biotechnology journal , v. 9, n. 7, p. 807-816, 2011.
Febre amarela	Proteína envelopada	<i>Nicotiana benthamiana</i>	VLP Transitório	GUIMARÃES, R. C. <i>et al.</i> Yellow fever vaccine, recombinant envelope protein (rYFE), plant derived, for active immunization: pre-clinical studies in mice and monkey models. Bio-Manguinhos , p. 52-53, Rio de Janeiro, 2016.

Fonte: extraído e adaptado de Maharjan; Choe, 2021.

A tabela 5 apresenta exemplos de vacinas VLPs à base de plantas para epidemias em estudo pré-clínico. Um ensaio pré-clínico de uma vacina candidata contra a febre amarela, denominada YFE-1T, foi conduzido pelo centro Fraunhofer de Biotecnologia molecular dos Estados Unidos da América (FhCMB) e Bio-Manguinhos/Fiocruz do Brasil. Esta vacina é baseada na proteína do envelope (YFE) da cepa 17DD do vírus da febre amarela e é produzida em plantas de *Nicotiana*

benthamiana, sendo posteriormente purificada e caracterizada tanto in vitro quanto in vivo. A eficácia da vacina foi testada em camundongos e macacos, avaliando a resposta dos anticorpos neutralizantes do vírus (Guimarães *et al.*, 2016).

Os camundongos receberam várias doses de YFE-1T (0,1µg, 0,2µg, 1µg, 5µg) com adjuvantes de hidróxido de alumínio e um adjuvante experimental à base de saponina. A vacinação ocorreu nos dias 0 e 28, com coleta de sangue para teste de neutralização por redução de placa (PRNT) sempre dois dias antes da aplicação dos antígenos. No dia 42, foi realizado um desafio intracerebral com o vírus da cepa 17DD (Guimarães *et al.*, 2016).

Por outro lado, 22 macacos rhesus (*Macaca mulatta*) foram vacinados com 10µg ou 30µg, também utilizando adjuvantes à base de hidróxido de alumínio e saponina. O cronograma de vacinação foi nos dias 0 e 30, com um desafio subcutâneo no dia 90. As amostras foram coletadas nos dias 3, 29, 60, 88 e 105, e a quantidade de vírus no sangue foi avaliada por reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) e ensaio de placas.

Os grupos que receberam o adjuvante à base de saponina apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) nos títulos médios de anticorpos neutralizantes para febre amarela. No entanto, apenas o grupo que recebeu a maior dose de antígeno apresentou título médio acima do ponto de corte para soropositividade ($2,6 \log_{10}$), um valor superior em comparação com a vacina comercial atenuada com título médio de $1,86 \log_{10}$ (Guimarães *et al.*, 2016).

A sobrevivência em ratos foi de 100% para os grupos com dose de 5µg de YFE-1T para ambos os adjuvantes. Contudo, o grupo que recebeu dose de 5µg com adjuvante à base de saponina não desenvolveu sintomas relacionados à infecção do vírus da sub-cepas 17DD em modelo murino, enquanto o grupo que recebeu a mesma dose com hidróxido de alumínio desenvolveu claudicação, paralisia dos membros posteriores e secreção ocular como sintomas (Guimarães *et al.*, 2016). O estudo original não cita os efeitos desencadeados no grupo de macacos. Assim, os resultados indicam que a proteína YFE-1T é uma potencial vacina contra a febre amarela a ser avaliada.

Outro estudo exemplificado na tabela 5, descreve as investigações realizadas em uma vacina candidata do tipo VLP contra a peste negra utilizando expressão transitória em *Nicotiana benthamiana*.

Algumas vacinas em teste para a peste contendo os antígenos F1 (LicKM-F1) ou Vdo *Yersinia pestis* (LicKM-LcrV), mostraram-se promissoras na proteção de modelos animais contra a peste pneumônica, a forma mais mortal da doença. Este estudo testa uma vacina que contém a proteína F1 e LcrV fundidas a uma única molécula de LicKM (LicKM-F1-LcrV), a enzima liquenase de *Clostridium thermocellum*, expressada e purificada a partir de plantas *Nicotiana benthamiana*. Quando administrada em macacos cynomolgus, induziu altos níveis de anticorpos IgG no sangue, especialmente do tipo IgG1, contra F1 e LcrV (Chichester *et al.*, 2009).

Quando as vacinas em teste foram formuladas com alúmen, a proteção aumentou em comparação com as subunidades isoladas. Os resultados mostraram que a vacina LicKM-LcrV-F1, produzida em plantas, é capaz de estimular o sistema imunológico e proporcionou proteção total em macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) contra o *Y. pestis* (Chichester *et al.*, 2009). Este estudo destaca o potencial das vacinas VLPs na prevenção de doenças sérias como a peste pneumônica.

4.6 Desafios e perspectivas para imunizantes VLP's vegetais.

O recente desenvolvimento de sistemas de expressão transitória baseados em vírus de plantas aumentou muito a velocidade e o rendimento da produção de VLP's. No entanto, para que vacinas à base de plantas se tornem mais amplamente disponíveis, vários desafios ainda precisam ser ultrapassados. Fischer; Buyel, (2020), elencam fatores que afetam a seleção de sistemas de expressão baseados em plantas, sendo eles: tempo de colocação no mercado; quantidade de tempo necessária para pesquisa e desenvolvimento (P&D); escalabilidade; e aprovação regulatória. Desses quatro fatores, tempo de colocação no mercado são os maiores determinantes no processo de seleção. Além disso, embora as plantas ofereçam uma vantagem durante o processo de pesquisa e desenvolvimento (expressão transitória mais rápida), o aumento da produção de proteínas produzidas por plantas é geralmente um desafio.

A relutância das grandes farmacêuticas em passar das plataformas de produção convencionais para as da nova geração também é um obstáculo a ultrapassar. Novas modificações na tecnologia usada para criar e entregar vacinas

impacta a indústria e leva a uma segmentação maior do mercado, pois qualquer diminuição ou alteração no ciclo de vida do produto da vacina original e custos totais da apresentação original não são recuperados e o fabricante é pressionado a investir mais para manter a quota de mercado (Kumraj *et al.*, 2022).

Muitas empresas maiores e mais antigas já pagaram suas instalações e podem vender uma parte do seu volume de produção próximo ou compatível ao custo dos produtos (Kumraj *et al.*, 2022). Os mercados mundiais privados e desenvolvidos que oferecem os maiores lucros enfrentam intensa concorrência de empresas que são bem estabelecidas e de grande reputação. O processo de fixação de preços tem um impacto significativo na adoção de novas vacinas e, portanto, culminam ou frustram anos de investigação e desenvolvimento científico para a saúde pública.

Em contrapartida, a produção de vacinas para atingir a população mundial como um todo, é o maior desafio da sociedade científica. Dessa forma, é de grande relevância que exista uma abordagem multifacetada na produção de vacinas para atender essa extensa demanda e reduzir a desconformidade na oferta de vacinas (Bhar, 2021). E o que pode impulsionar isso é a colaboração sustentada entre cientistas de plantas, imunologistas e vacinologistas para manter o avanço no desenvolvimento de vacinas eficazes e econômicas. Essa abordagem requer investigação inovadoras para discutir questões relacionadas à segurança, usando estratégias para melhorar a imunogenicidade, como também, recursos econômicos significativos ofertados por organizações públicas e sem fins lucrativos, além de investimentos por parte da indústria para aprimorar e estabelecer essa tecnologia (Govea-Alonso; Rybicki; Rosales-Mendoza, 2014).

A colaboração entre organizações não governamentais, empresas de países desenvolvidos e instituições de países em desenvolvimento é um passo importante para expandir a pesquisa e os ensaios clínicos relacionados às VLPs vegetais. Um exemplo disso foi a colaboração entre a Fiocruz/Bio-Manguinhos (Brasil) com a iBio Inc., (EUA) para fabricar uma vacina contra o vírus da febre amarela usando plantas (Guimarães *et al.*, 2016).

Apesar dos desafios tecnológicos, progressos significativos estão sendo feitos, com os principais sistemas de plantas alcançando rendimentos consistentes e elevados. Recentemente a prova da consistência entre lotes de uma vacina derivada de plantas foi alcançada num ensaio clínico, onde três lotes sequenciais de uma

vacina quadrivalente contra a gripe de partículas semelhantes a vírus (QVLP) produzida em *N. benthamiana* resultou em respostas de anticorpos equivalentes as proteínas hemaglutinina (HA) em um estudo clínico de fase III. De acordo com essa análise, pela primeira vez uma vacina produzida em plantas atendeu aos critérios padrão de consistência de produção (Ward *et al.*, 2021).

Por fim, para que vacinas VLPs de plantas se expandam no mercado, é essencial que os desenvolvedores e fabricantes atendam aos critérios regulatórios estabelecidos pelas autoridades competentes em saúde pública. Considerando requisitos chaves como: eficácia e segurança; padrões criteriosos de fabricação; para garantir a qualidade, pureza e consistência da vacina, o que inclui boas práticas de fabricação (BPF) e a implementação de sistemas de controle de qualidade ao longo de todo o processo de produção. Incluindo também estudos de estabilidade; para avaliar a durabilidade das vacinas candidatas e condições de armazenamento; submissão de documentação detalhada para aprovação regulatória e implementação de monitoramento pós-comercialização (Hemmati *et al.*, 2022). Portanto, esses passos são essenciais para garantir a confiança das autoridades regulatórias e do público na qualidade e eficácia dessas vacinas.

5 CONCLUSÃO

A produção de vacinas é um processo industrial desafiador que engloba diversos fatores de influência para o seu desenvolvimento e comercialização. O período necessário desde a etapa de criação até a comercialização pode levar anos e requer recursos financeiros consideráveis e mão de obra abundante e qualificada. Dessa forma, a produção de vacinas através da agricultura molecular vegetal pode trazer oportunidades para suprir estas limitações, sendo ela um processo facilmente escalável e que se mostra mais econômico do que os métodos convencionais.

Existem inúmeras e complexas razões para o lento progresso da agricultura molecular de plantas (PMF), entre eles estão a regulamentação estrita de produtos de organismos geneticamente modificados (OGM) e farmacêuticos. Além disso, há relutância da indústria farmacêutica para reestruturação da sua infraestrutura de fermentação. Assim, as abordagens de bioengenharia baseadas em plantas poderiam atender à gradativa demanda por produtos biofarmacêuticos inovadores à base de proteínas, somando o fato que sistemas baseados em células de mamíferos podem enfrentar escassez de habilidades para aplicabilidade diversas.

O caminho das vacinas à base de plantas chegar ao mercado e ter sua tecnologia explorada substancialmente ainda é longo. A construção desde o nível de pesquisa básica a nível industrial regulamentar precisa de reformas técnicas que cumpram os requisitos regulamentares, promovendo conjuntamente a aceitação social e políticas de exploração da tecnologia para países em desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

- AYRES, A. R. G. *et al.* Vigilância epidemiológica. **ARCA-Fiocruz**, cap. 5, pág.1-36, Rio de Janeiro, 2020.
- CAIADO, B. V. R. **Produção de Partículas Semelhantes a Vírus (VLPs) do Vírus da Hepatite A para Fins Diagnósticos e Vacinas**. Tese de doutorado. Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.
- CASTILLO, S. I. V.; SANTOS, D. O.; CASTRO, H. C. O. Fake News no contexto da pandemia de COVID-19: considerações a partir da cultura política. **Rizoma**, v. 8, n. 1, p. 165-184, Rio Grande do Sul, 2020.
- CERVERA, L. *et al.* Production of HIV-1-based virus-like particles for vaccination: achievements and limits. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 18, p. 7367-7384, 2019.
- CHABEDA, A. *et al.* Substitution of human papillomavirus type 16 L2 neutralizing epitopes into L1 surface loops: the effect on virus-like particle assembly and immunogenicity. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 779, 2019.
- CHICHESTER, J. A. *et al.* A single component two-valent LcrV-F1 vaccine protects non-human primates against pneumonic plague. **Vaccine**, v. 27, n. 25-26, p. 3471-3474, 2009.
- CHICHESTER, J. A. *et al.* Safety and immunogenicity of a plant-produced Pfs25 virus-like particle as a transmission blocking vaccine against malaria: A Phase 1 dose-escalation study in healthy adults. **Vaccine**, v. 36, n. 39, p. 5865-5871, 2018.
- CHICHESTER, J. A. *et al.* Safety and immunogenicity of a plant-produced recombinant hemagglutinin-based influenza vaccine (HA1-05) derived from A/Indonesia/05/2005 (H5N1) influenza virus: a phase 1 randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study in healthy adults. **Viruses**, v. 4, n. 11, p. 3227-3244, 2012.
- CHUNG, Y. H. *et al.* Integrating plant molecular farming and materials research for next-generation vaccines. **Nature Reviews Materials**, v. 7, n. 5, p. 372-388, 2021.
- CID, R.; BOLÍVAR, J. Platforms for production of protein-based vaccines: From classical to next-generation strategies. **Biomolecules**, v. 11, n. 8, p. 1072, 2021.
- CITIULO, F. *et al.* Frontiers in the standardization of the plant platform for high scale production of vaccines. **Plants**, v. 10, n. 9, p. 1828, 2021.
- CONLEY, A. J. *et al.* Recombinant protein production in a variety of *Nicotiana* hosts: a comparative analysis. **Plant Biotechnology journal**, v. 9, n. 4, p. 434-444, 2010.
- CRISCI, E.; BÁRCENA, J.; MONTOYA, M. Virus-like particle-based vaccines for animal viral infections. **Inmunologia**, v. 32, n. 3, p. 102-116, 2013.

CUMMINGS, J. F. *et al.* Safety and immunogenicity of a plant-produced recombinant monomer hemagglutinin-based influenza vaccine derived from influenza A (H1N1) pdm09 virus: a Phase 1 dose-escalation study in healthy adults. **Vaccine**, v. 32, n. 19, p. 2251-2259, 2014.

DAMIACO, C. *et al.* Development of vaccine formulations: past, present, and future. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 11, n. 2, p. 353-372, 17 fev. 2021.

D'AOUST, M. A. *et al.* Influenza virus-like particles produced by transient expression in *Nicotiana benthamiana* induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice. **Plant biotechnology journal**, v. 6, n. 9, p. 930–940, 2008.

DELVES, P. J. *et al.* ROITT - **Fundamentos de Imunologia**, ed. 13, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2018.

DINIZ, M. O.; FERREIRA, L. C. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Dossiê Biotecnologia**, v. 24, n. 70, p. 19-30, 2010.

DUARTE, A. **Entenda como funciona a produção de uma vacina em 5 passos**. PUC-RS, 2021. Disponível em: <https://www.pucrs.br/blog/entenda-comofunciona-a-producao-de-uma-vacina-em-5-passos/>. Acesso em: 17 de outubro de 2023.

DUARTE, C. I. S. **Vacinas e plantas, relação em larga escala**. Dissertação de mestrado. Universidade Fernando Pessoa. Porto, Portugal, 2016. Disponível em: <https://bdigital.ufp.pt/handle/10284/5818>. Acesso em: 22 de novembro de 2023.

ENDO, T. H. *et al.* Vacinas virais e perspectivas para o controle de epidemias e pandemias. **Ciências da saúde: desafios, perspectivas e possibilidades – Volume 1**. Guarujá, SP: Editora Científica Digital, p. 249–277, 2021.

ESCALANTE, E. M. *et al.* Plant-based vaccines: Antigen Design, Diversity, and strategies for high Level production. **Vaccines**, v. 10, n. 1, p. 100, 2022.

EIBEN, S. *et al.* Plant virus-based materials for biomedical applications: Trends and prospects. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 145, p. 96-118, 2019.

FAHAD, S. *et al.* Recent developments in therapeutic protein expression technologies in plants. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 2, p. 265-279, 2014.

FEIJÓ, R. B.; SÁFADI, M. A. P. Imunizações: três séculos de uma história de sucessos e constantes desafios. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 7, p. 1-3, 2006. Rio de Janeiro.

FENNER, F. *et al.* Smallpox and its eradication. **World Health Organization**, Geneva, 1988.

FERNANDES, J. *et al.* **Vacinas**. Rio de Janeiro, RJ. Editora FIOCRUZ, 2021.

FIOCRUZ. **Perguntas frequentes: vacinas**. Rio de Janeiro, RJ, 2022. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/perguntas-frequentes/perguntas-frequentes-vacinas-menu-topo>. Acesso em: 30 de setembro de 2023.

FISCHER, R.; BUYEL J. F. Molecular farming - The slope of enlightenment. **Biotechnology Advances**, v. 40, p. 107519, 2020.

FONSECA, E. M.; SHADLEN, K. C.; BASTOS, F. I. The politics of COVID-19 vaccination in middle-income countries: Lessons from Brazil. **Social science & medicine**, v. 281, n. 114093, p. 114093, 2021.

FORNI, G.; MANTOVANI, A. COVID-19 vaccines: where we stand and challenges ahead. **Cell Death & Differentiation**, v. 28, n. 2, p. 626-639, 2021.

FRAUNHOFER - CENTER FOR MOLECULAR BIOTECHNOLOGY. PA83-FhCMB Plant-Derived Recombinant Protective Antigen (rPA) Anthrax Vaccine. **ClinicalTrials.gov**. Dez. 2016. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02239172>. Acesso em: 25 jan. 2024.

FUENMAYOR, J.; GÒDIA, F.; CERVERA, L. Production of virus-like particles for vaccines. **New Biotechnology**, v. 39, p. 174-180, out. 2017.

GOBEIL, P. *et al.* Interim report of a phase 2 randomized trial of a plant-produced virus-like particle vaccine for Covid-19 in healthy adults aged 18-64 and older adults aged 65 and older. **MedRxiv**, 2021.

GORANTALA, J. *et al.* Generation of protective immune response against anthrax by oral immunization with protective antigen plant-based vaccine. **Journal of Biotechnology**, v. 176, p. 1-10, abr. 2014.

GOVEA-ALONSO, D. O.; RYBICKI, E.; ROSALES-MENDOZA, S. Plant-based vaccines as a global vaccination approach: Current perspectives. Genetically Engineered Plants as a Source of Vaccines Against Wide Spread Diseases: An Integrated View. **Springer**, p. 265-280, 2014.

GUIMARÃES, R. C. *et al.* Yellow fever vaccine, recombinant envelope protein (rYFE), plant derived, for active immunization: Pre-clinical studies in mice and monkey models. **Bio-Manguinhos/Fiocruz**, p. 52-53. Rio de Janeiro, 2016.

HAGER K. J. *et al.* Efficacy and Safety of a Recombinant Plant-Based Adjuvanted Covid-19 Vaccine. **The new England journal of medicine**, v. 386, n. 22, p. 2084-2096, 2022.

HEMMATI, F. *et al.* Plant-derived VLP: a worthy platform to produce vaccine against SARS-CoV-2. **Biotechnology Letters**. Springer Science and Business Media, v. 44, n. 1, p. 45-57, 2021.

HOMMA, A. *et al.* Vacinas e vacinação no Brasil: Horizontes Para Os Próximos 20 Anos. **ARCA-Fiocruz**, Rio de Janeiro, 2020.

HUANG, Z. *et al.* Virus-like particle expression and assembly in plants: hepatitis B and Norwalk viruses. **Vaccine**, v. 23, n. 15, p. 1851-1858, 2005.

Instituto Butantan. **A velocidade com que foi criada a vacina da Covid-19 é motivo de preocupação?** Especialista do Butantan responde. São Paulo, 13 de abr. 2022. Disponível em: <https://butantan.gov.br/covid/butantan-tira-duvida/tira-duvida-noticias/a-velocidade-com-que-foi-criada-a-vacina-da-covid-19-e-motivo-de-preocupacao-especialista-do-butantan-responde>. Acesso em: 21 de fev. 2024.

JEFFERYS, R. The HIV Vaccines, Passive Immunization, and Antibody Gene Transfer Pipeline. **Treatment Action Group**. Jul. 2018. Disponível em: <https://www.treatmentactiongroup.org/resources/pipeline-report/2018-pipeline-report/the-hiv-vaccines-passive-immunization-and-antibody-gene-transfer-pipeline/>. Acesso em: 21 jan. 2024.

JONES, R. M. *et al.* A plant-produced Pfs25 VLP malaria vaccine candidate induces persistent transmission blocking antibodies against *Plasmodium falciparum* in immunized mice. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e79538, 2013.

JIMENEZ, J.; LEIVA, A. M.; CUELLAR, W. J. Cassava torrado-like virus encodes a gene that facilitates the mechanical transmission to *Nicotiana benthamiana* of Cassava virus X. **Scientia Agropecuaria**, Trujillo, v. 14, n. 2, p. 213-221, 2023.

KAPUSTA, J. *et al.* A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. **The FASEB journal**, v. 13, n. 13, p. 1796-1799, 1999.

KASHIMA, K. *et al.* Good manufacturing practices production of a purification-free oral cholera vaccine expressed in transgenic rice plants. **Plant cell reports**, v. 35, p. 667-679, 2016.

KAYSER, V.; RAMZAN, I. Vaccines and vaccination: history and emerging issues. **Human Vaccines e Immunotherapeutics**. v. 17, n. 12, p. 5255-5268, 2021.

KBIO INC. KBP-201 COVID-19 Vaccine Trial in Healthy Volunteers. **ClinicalTrials.gov**. Out. 2023. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04473690>. Acesso em: 15 jan. 2024.

MAHARJAN, P. M.; CHOE, S. Plant-based COVID-19 vaccines: Current status, design, and development strategies of candidate vaccines. **Vaccines**. v. 9, n. 9, p. 992, 6 set. 2021.

MAHMOOD, N.; NASIR, S. B.; HEFFERON, K. Plant-based drugs and vaccines for COVID-19. **Vaccines**. v. 9, n. 1, p. 15, 30 dez. 2020.

MAJOR, D. *et al.* Intranasal vaccination with a plant-derived H5 HA vaccine protects mice and ferrets against highly pathogenic avian influenza virus challenge. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 11, n. 5, p. 1235-1243, 2015.

MAMEDOV, T. *et al.* Engineering, production and characterization of Spike and Nucleocapsid structural proteins of SARS-CoV-2 in *Nicotiana benthamiana* as vaccine candidates against COVID-19. **Biorxiv**, 2020.

MASSA, S.; PRESENTI, O.; BENVENUTO, E. Engineering Plants for the Future: Farming with Value-Added Harvest. **Progress in Botany** Vol. 80, p. 65–108, 2018.

MEDICAGO. Study of a Recombinant Coronavirus-Like Particle COVID-19 Vaccine in Adults. **ClinicalTrials.gov**. Jun. 2022. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04636697>. Acesso em: 20 jan. 2024.

MOON, K. B. *et al.* Development of Systems for the Production of Plant-Derived Biopharmaceuticals. **Plants**. v. 9, n. 1, p. 30, 2019.

MORADI, V. M. *et al.* Hepatitis B core-based virus-like particles: A platform for vaccine development in plants. **Biotechnology Reports**. v. 29. 2021.

MUTHAMILSELVAN, T.; KHAN, M. R. I.; HWANG, I. Assembly of Human Papillomavirus 16 L1 Protein in *Nicotiana benthamiana* Chloroplasts into Highly Immunogenic Virus-Like Particles. **Journal of Plant Biology**. v. 66, n. 4, p. 331-340, 2023.

NOORAEI, S. *et al.* Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. **Journal of Nanobiotechnolgy**. v 19, n. 59, 2021.

Organização Mundial da Saúde. **WHO COVID-19 dashboard**. 2024. Disponível em: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases>. Acesso em: 22 de fev. 2024.

Organização Mundial da Saúde. WHO chief declares end to COVID-19 as a global health emergency. **United Nations**, 5 de mai. 2023. Disponível em: <https://news.un.org/en/story/2023/05/1136367>. Acesso em: 21 de fev. 2024.

PANG, E. L. *et al.* Epitope presentation of dengue viral envelope glycoprotein domain III on hepatitis B core protein virus-like particles produced in *Nicotiana benthamiana*. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 455, 2019.

PEYRET, H. *et al.* Producing vaccines against enveloped viruses in plants: Making the impossible, difficult. **Vaccines**, v. 9, n. 7, p. 780, 2021.

PHOOLCHAROEN, W. *et al.* Expression of an immunogenic Ebola immune complex in *Nicotiana benthamiana*. **Plant biotechnology journal**, v. 9, n. 7, p. 807-816, 2011.

PILLET, S. *et al.* Humoral and cell-mediated immune responses to H5N1 plant-made virus-like particle vaccine are differentially impacted by alum and GLA-SE adjuvants in a Phase 2 clinical trial. **npj Vaccines**, v. 3, n. 1, p. 3, 2018.

PILLET, S. *et al.* Plant-derived H7 VLP vaccine elicits protective immune response against H7N9 influenza virus in mice and ferrets. **Vaccine**, v. 33, n. 46, p. 6282-6289, 2015.

PLOTKIN, S. A. Vaccines: past, present and future. **Nature Medicine**. v.11, 2005.

PLUMMER, E. M.; MANCHESTER, M. Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 3, n. 2, p. 174-196, 2011.

POLLARD, A.; BIJKER, E. M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. **Nature Reviews Immunology**. v.21, p. 83-100, 2020.

PONNDORF, D. *et al.* Plant-made dengue virus-like particles produced by co-expression of structural and non-structural proteins induce a humoral immune response in mice. **Plant Biotechnology Journal**, v. 19, n. 4, p. 745-756, 2021.

PRATES-SYED, W. A. *et al.* Vlp-based covid-19 vaccines: An adaptable technology against the threat of new variants. **Vaccines**. v. 9, n. 12, p. 1409, 30 nov. 2021.

PYRSKI, M. *et al.* Parenteral–oral immunization with plant-derived HBcAg as a potential therapeutic vaccine against chronic hepatitis B. **Vaccines**, v. 7, n. 4, p. 211, 2019.

REDKIEWICZ, P. *et al.* Plant expression systems for production of hemagglutinin as a vaccine against influenza virus. **Acta Biochimica Polonica**. v. 61, n. 3, p.551-560, 2014.

RIBEIRO, H. F. *et al.* **Imunologia Clínica**. Porto Alegre: SAGAH, 2019.

ROBERTS, H. *et al.* To vax or not to vax: Predictors of anti-vax attitudes and COVID-19 vaccine hesitancy prior to widespread vaccine availability. **PloS one**, v. 17(2), 2022.

ROSALES-MENDOZA, S. *et al.* What does plant-based vaccine technology offer to the fight against COVID-19? **Vaccines**. v. 8, n. 2, p.183. 2020.

RYBICKI, E. P. Plant-made vaccines for humans and animals. **Plant Biotechnology Journal**. v. 8, n. 5, p. 620-637, 2010.

SAALE, H. Icon Genetics clinical development of its novel norovirus vaccine reaches milestone of complete dosing of the first cohort. **Icon Genetics**. Out. 2020. Disponível em: <https://www.icongenetics.com/icon-genetics-clinical-development-of-its-novel-norovirus-vaccine-reaches-milestone-of-complete-dosing-of-the-first-cohort/>. Acesso em: 22 jan. 2024.

SAMPEDRO, L. S. *et al.* The evolution of poxvirus vaccines. **Viruses**. v. 7, n. 4, p. 1726-1803, 2015.

SANTANA, M. A. D. C. *et al.* COVID-19, fake news e vacinação: os desafios enfrentados na saúde pública. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 5, n. 4, p. 2530-2541, 2023.

SCHATZMAYR, H. Novas perspectivas em vacinas virais. **História, Ciência, Saúde-Manguinhos**. v. 10, p. 655-659, 2003.

SCHILLBERG, S. *et al.* Critical analysis of the commercial potential of plants for the production of recombinant proteins. **Frontiers in Plant Science**. v. 10. 2019.

SHANMUGARAJ, B. *et al.* Potential for Developing Plant-Derived Candidate Vaccines and Biologics against Emerging Coronavirus Infections. **Pathogens**. v. 10, n. 8, p. 1051. 2021.

SILVA, A. G. **Imunologia aplicada**: fundamentos, técnicas laboratoriais e diagnósticos. 1 ed. – Érika. São Paulo, 2014.

STANDER, J. *et al.* A plant-produced virus-like particle displaying envelope protein domain III elicits an immune response against west Nile virus in mice. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 738619, 2021.

STANDER, J.; MBEWANA, S.; MEYERS, A. E. Plant-Derived Human Vaccines: Recent Developments. **BioDrugs**. v. 36, n. 5, p. 573-589. 2022.

SU, H. *et al.* Plant-Produced Vaccines: Future Applications in Aquaculture. **Frontiers in Plant Science**. v. 12. 2021.

TACKET, C. O. *et al.* Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. **The journal of infectious diseases**, v. 182, n. 1, p. 302-305, 2000.

TAKEYAMA, N.; KIYONO, H.; YUKI, Y. Plant-based vaccines for animals and humans: recent advances in technology and clinical trials. **Therapeutic advances in vaccines**, v. 3, n. 5-6, p. 139-154, 2015.

TARIQ, H. *et al.* Virus-Like Particles: Revolutionary Platforms for Developing Vaccines Against Emerging Infectious Diseases. **Frontiers in Microbiology**. v.12. 2022.

TEIXEIRA, A. **Fake news contra a vida**: desinformação ameaça vacinação de combate à febre amarela. Dissertação de mestrado. Pontifícia Universidade Católica, São Paulo, 2018.

THANAVALA, Y. *et al.* Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 9, p. 3378-3382, 2005.

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

THUENEMANN, E. C. *et al.* A method for rapid production of heteromultimeric protein complexes in plants: assembly of protective bluetongue virus-like particles. **Plant biotechnology journal**, v. 11, n. 7, p. 839-846, 2013.

TUSÉ, D. *et al.* Safety and immunogenicity studies in animal models support clinical development of a bivalent norovirus-like particle vaccine produced in plants. **Vaccine**, v. 40, n. 7, p. 977-987, 2022.

TUSÉ, D. *et al.* Clinical Safety and Immunogenicity of Tumor-Targeted, Plant-Made Id-KLH Conjugate Vaccines for Follicular Lymphoma. **Biomed Research International**, 2015, 648143. 2015.

VAHDAT, M. M. *et al.* Hepatitis B core-based virus-like particles: A platform for vaccine development in plants. **Biotechnology Reports**. v. 29. 2021.

VERMIJ, P.; WALTZ, E. USDA approves the first plant-based vaccine. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 234, 2006.

WARD, B. J. *et al.* Phase III: Randomized observer-blind trial to evaluate lot-to-lot consistency of a new plant-derived quadrivalent virus like particle influenza vaccine in adults 18-49 years of age. **Vaccine**. v. 39, n. 10, p. 1528-1533. 2021.

WARD, B. J. *et al.* Efficacy, immunogenicity, and safety of a plant-derived, quadrivalent, virus-like particle influenza vaccine in adults (18-64 years) and older adults (≥65 years): two multicentre, randomised phase 3 trials. **The Lancet**. v. 396, n. 10261, p. 1491-1503. 2020.

YUSIBOV, V. *et al.* Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. **Vaccine**, v. 20, n. 25-26, p. 3155-3164, 2002.

YUSIBOV, V. *et al.* Peptide-based candidate vaccine against respiratory syncytial virus. **Vaccine**, v. 23, n. 17-18, p. 2261-2265, 2005.

YUSIBOV, V.; KUSHNIR, N.; STREATFIELD, S. J. Advances and challenges in the development and production of effective plant-based influenza vaccines. **Expert Review of Vaccines**. v. 14, n. 4, p. 519-535. 2014.

YUSIBOV, V.; RABINDRAN, S. Recent progress in the development of plant-derived vaccines. **Expert Review of Vaccines**. v. 7, n. 8, p. 1173-1183. 2008.

ZAHMANOVA, G. *et al.* Efficient production of chimeric hepatitis B virus-like particles bearing an epitope of hepatitis E virus capsid by transient expression in *Nicotiana benthamiana*. **Life**, v. 11, n. 1, p. 64, 2021.

ZAHMANOVA, G. *et al.* Plant-Derived Recombinant Vaccines against Zoonotic Viruses. **Life**. v. 12, n. 2, p. 156, 2022.

ZAHMANOVA, G. *et al.* The Plant Viruses and Molecular Farming: How Beneficial They Might Be for Human and Animal Health? **International Journal of Molecular Sciences**. v. 24, n. 2, p. 1533. 2023.