



**INSTITUTO  
FEDERAL**  
Rio de Janeiro

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

*Campus Realengo*

Curso de Graduação em Farmácia

Vitória Miranda Barros

**MÉTODOS ALTERNATIVOS DE  
PRODUÇÃO DA VACINA  
CONTRA A FEBRE AMARELA:  
UMA BREVE REVISÃO DA  
LITERATURA**

Rio de Janeiro

2020

VITÓRIA MIRANDA BARROS

**MÉTODOS ALTERNATIVOS DE PRODUÇÃO DA VACINA CONTRA A  
FEBRE AMARELA: UMA BREVE REVISÃO DA LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadores: Prof. Dr. Pedro Paulo de Abreu Manso (Fiocruz) e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Débora Leandro Rama Gomes (IFRJ).

Rio de Janeiro  
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação.

Elaborada por Alane Elias Souza

Bibliotecária - CRB 7 nº 6321

B277

Barros, Vitória Miranda.

Métodos alternativos de produção da vacina contra a febre amarela : uma breve revisão de literatura. / Vitória Miranda Barros, 2020.  
40f. :il.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Farmácia) – Instituto Federal do Rio de Janeiro, 2020.

Orientadoras: Débora Leandro Rama Gomes e Pedro Paulo de Abreu Manso.

1. Febre amarela. 2. Vacina. 3. Produção de vacina. 4. Segurança vacinal. I. Instituto Federal do Rio de Janeiro. Campus Realengo. II. Gomes, Débora Leandro Rama. III. Manso, Pedro Paulo de Abreu. IV. Título.

COBIB/CReal

CDU 615

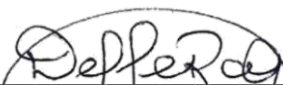
VITÓRIA MIRANDA BARROS

**MÉTODOS ALTERNATIVOS DE PRODUÇÃO DA VACINA CONTRA A FEBRE  
AMARELA: UMA BREVE REVISÃO DA LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como parte dos requisitos  
necessários para a obtenção do título de  
Bacharel em Farmácia.

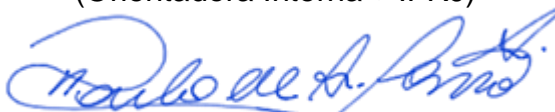
Data da aprovação: 21/06/2021.

Banca Examinadora:



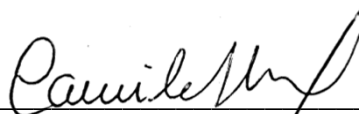
---

**Profª Drª Débora Leandro Ramã Gomes**  
(Orientadora Interna – IFRJ)



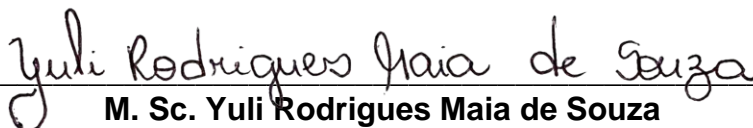
---

**Prof. Dr. Pedro Paulo de Abreu Manso**  
(Orientador Externo – Fiocruz)



---

**Profª Drª Camila Alves Bandeira Falcão**  
(Membro Interno da Banca – IFRJ)



---

**M. Sc. Yuli Rodrigues Maia de Souza**  
(Membro Externo da Banca – Fiocruz)

Rio de Janeiro  
2020

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por todas as bênçãos em minha vida, pela oportunidade de ser forte e paciente para alcançar meus objetivos e realizar este sonho.

Muitas pessoas foram fundamentais para que mais esse ciclo chegasse ao fim. Desta forma, escrevo aqui um agradecimento especial a algumas delas.

Agradeço à minha mãe por todo apoio e dedicação em todos os momentos da minha vida, por ser fundamental na minha criação e em todas as minhas escolhas. Agradeço ao meu grande amor Christian, por todo apoio e companheirismo nesses 11 anos ao meu lado. Obrigada por ser o maior incentivador da minha trajetória acadêmica em todas as etapas, por não me deixar desistir. Obrigada por tudo.

Agradeço a toda minha família, em especial a minha irmã Geisa, meu pai, minha vó e meus padrinhos que foram grandes incentivadores na minha trajetória até aqui.

Agradeço aos meus amigos da faculdade e da vida que estiveram ao meu lado durante esses cinco anos, em especial, o meu “farma squad”, o “HSM” e o “ETERnamente”, ao meu amigo Tarcio e minhas amigas Rayanne e Camila Lima. Agradeço pela parceria, por todas as risadas, lágrimas e reclamações (que não foram poucas), vocês fazem parte da minha história.

Agradeço ao meu orientador Dr. Pedro Paulo, que me recebeu como aluna de iniciação científica, pela paciência, dedicação e por todo apoio na elaboração e correção deste trabalho. Agradeço também à minha co-orientadora Yuli Maia pelo apoio durante todo período em que fiz parte do LABPAT. Vocês contribuíram muito na construção da minha caminhada profissional e também pessoal.

Agradeço à minha orientadora Débora Rama por todo conhecimento compartilhado, pela confiança em me aceitar como monitora de Microbiologia Clínica e por toda orientação para a conclusão deste ciclo.

Agradeço à minha amiga Anne por todo apoio e amizade. À minha amiga Milena que esteve comigo desde o ensino médio, na enfermagem e farmácia, são incontáveis os nossos bons momentos. Obrigada por tudo que vocês fizeram e ainda fazem por mim, vocês são essenciais na minha vida.

BARROS, V. M. Métodos alternativos de produção da vacina contra a febre amarela: uma breve revisão da literatura. 40 p. Trabalho de Conclusão de Curso. Bacharelado em Farmácia. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *Campus Realengo*, Rio de Janeiro, RJ, 2020.

## RESUMO

A febre amarela é uma doença causada pelo vírus da febre amarela, que foi isolado pela primeira vez na África Ocidental em 1927. A vacina contra a febre amarela atenuada é segura e confere proteção a longo prazo, sendo a vacinação o método mais eficiente para a prevenção de surtos da doença. As restrições de administração para alguns grupos de pessoas e raros eventos adversos graves causados pela imunização estimularam a busca por novos métodos de produção da vacina contra a febre amarela. Este trabalho teve por objetivo realizar uma revisão da literatura sobre os principais estudos que buscam o desenvolvimento de vacinas alternativas à atual. Há evidências experimentais que sugerem que a proteína E, presente na estrutura da partícula viral, está relacionada a diferentes fases da infecção celular, sendo assim um alvo no desenvolvimento de vacinas de subunidade. Os dados compilados nesta revisão mostraram que o uso de adjuvantes, análises em diferentes modelos animais e uso de sistemas alternativos de produção podem ser promissores no desenvolvimento de candidatos a vacina contra febre amarela. Concluimos que são necessárias maiores investigações nos métodos estudados nos últimos anos, porém espera-se, assim, que no futuro esses candidatos possam ser utilizados como imunizantes seguros e eficazes para a população sob todas as condições de saúde.

Palavras-chave: febre amarela; vacina; produção de vacina; segurança vacinal.

BARROS, V. M. Alternative methods of yellow fever vaccine production: a brief review of the literature. 40 p. Trabalho de Conclusão de Curso. Bacharelado em Farmácia. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *Campus Realengo*, Rio de Janeiro, RJ, 2020.

## **ABSTRACT**

Yellow fever is a disease caused by the yellow fever virus, which was first isolated in West Africa in 1927. Attenuated yellow fever vaccine is safe and provides long-term protection, with vaccination being the most efficient method of prevention of disease outbreaks. Administration restrictions for some groups of people and rare serious adverse events caused by immunization have stimulated the search for new methods of producing yellow fever vaccine. This study aimed to conduct a review of the literature on the main studies that seek the development of vaccines alternative to the current one. There is experimental evidence suggesting that protein E, present in the viral particle structure, is related to different stages of cellular infection, thus being a target in the development of subunit vaccines. The data compiled in this review showed that the use of adjuvants, analyzes in different animal models and the use of alternative production systems can be promising in the development of yellow fever vaccine candidates. We conclude that further investigations are needed, but it is expected that in the future these candidates can be used as safe and effective immunization agents for the population under all health conditions.

Keywords: yellow fever; vaccine; vaccine production; vaccine safety.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de transmissão do vírus da febre amarela.....	10
Figura 2 – Esquema estrutural de um flavivírus.....	15
Figura 3 – O genoma viral de um flavivírus.....	15
Figura 4 – O ciclo de replicação de um flavivírus.....	16
Figura 5 – Titulação por PFU em diferentes estágios de diferenciação.....	25
Figura 6 – Linha do tempo da descoberta de adjuvantes de vacinas.....	29



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAMP: Do inglês "*Danger Associated Molecular Pattern*"

Fiocruz: Fundação Oswaldo Cruz

GV: Granulovirus

IFN- $\gamma$ : Interferon gama

IL-2: Interleucina-2

MIP1b: Do inglês "*Macrophage Inflammatory Protein-1*"

MOI: Multiplicidade de infecção

MVA: Vaccinia modificado Ankara

NPV: Do inglês "*Nucleopolyhedrovirus*"

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos

PNH: Primatas não humanos

PFU: Unidade de formação de placas

SARS-CoV-2: Síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2

TNF $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral Alfa

TLR: Do inglês "*Toll-Like Receptors*"

YEL-AVD: Do inglês "*Vaccine Associated Viscerotropic Disease*"

YEL-AND: Do inglês "*Vaccine Associated Neurotropic Disease*"

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 OBJETIVOS .....	12
1.1.1 <b>Objetivo geral</b> .....	12
1.1.2 <b>Objetivos específicos</b> .....	12
<b>2 DESENVOLVIMENTO</b> .....	13
2.1 METODOLOGIA .....	13
2.2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	13
2.2.1 <b>Febre amarela: aspectos gerais</b> .....	13
2.2.2 <b>O vírus da febre amarela</b> .....	14
2.2.3 <b>A vacina atenuada para febre amarela FA17DD</b> .....	16
2.2.4 <b>Resposta imunológica</b> .....	18
2.2.5 <b>Efeitos adversos graves causados pela vacina FA17DD</b> .....	19
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
2.3.1 <b>Métodos alternativos de produção</b> .....	20
2.3.1.1 Vacina inativada: cultura de células como plataforma de produção viral	21
2.3.1.2 Vacinas de DNA.....	23
2.3.1.3 Vacina de vetor viral: MVA-BN-YF .....	24
2.3.1.4 Aplicação do modelo de cultura muscular esquelética para desenvolvimento de um potencial candidato a vacina.....	24
2.3.1.5 Vacina de subunidade utilizando <i>Escherichia coli</i> .....	25
2.3.1.6 Vacina de subunidade: expressão em plataforma vegetal.....	26
2.3.1.7 Vacina de subunidade: expressão em baculovírus.....	27
2.3.1.8 Adjuvantes .....	28
2.3.1.9 Vacina combinada: vírus quimérico de febre amarela .....	30
2.3.2 <b>Vantagens e desvantagens dos métodos de produção de vacinas</b> ....	31
<b>3 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	33
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	34

## 1 INTRODUÇÃO

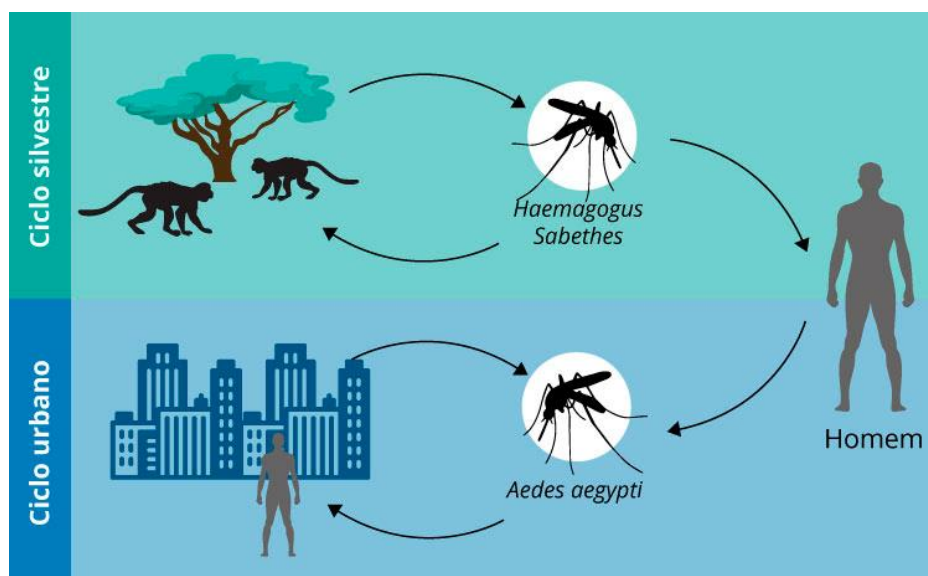
A febre amarela é uma doença causada pelo vírus da febre amarela, que foi isolado pela primeira vez na África Ocidental em 1927. O vírus pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, possui envelope, genoma composto de RNA de fita simples e polaridade positiva, com 10.500-11.000 nucleotídeos de comprimento (BARRETT; HIGGS, 2007).

O vírus é constituído por três proteínas estruturais: proteína M (membrana), proteína C (capsídeo) que auxilia na formação do nucleocapsídeo e proteína E (envelope) (BECK *et al.*, 2013).

A febre amarela possui dois ciclos epidemiológicos distintos: o ciclo silvestre e o ciclo urbano (Figura 1). O ciclo silvestre é de maior complexidade e varia de acordo com a região onde ocorre. Nas Américas, o vetor artrópode, dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* transmite o vírus ao primata não-humano (VASCONCELOS, 2002).

No ciclo urbano, o *Aedes aegypti* é o principal responsável pela transmissão para o hospedeiro humano, que quando não vacinado, pode desenvolver a febre amarela e tornar-se fonte de infecção para novos mosquitos, dando continuidade ao ciclo até que este seja interrompido por meio de vacinação da população ou ausência de pessoas susceptíveis (VASCONCELOS, 2003).

Figura 1 — Ciclo de transmissão do vírus da febre amarela.



Fonte: Ministério da Saúde, 2013.

A doença se desenvolve após o período de incubação do vírus, que varia entre três e seis dias. Duas formas clínicas distintas são descritas, a forma visceral clássica e a forma neurotrópica. O desenvolvimento neurotrópico da febre amarela, geralmente, está associado a efeitos adversos pós vacinação. Na forma clássica, a febre amarela é descrita em três estágios clínicos, nos humanos, iniciando com o período de viremia onde os sintomas como a febre (aproximadamente 39 ° C), mal estar, náuseas, vômitos e mialgia começam a surgir, tendo duração de três a cinco dias. Após o período de viremia, tem início o período de remissão onde há ausência da febre e os demais sintomas. Neste período pode ocorrer a recuperação dos pacientes sem outros sintomas (KITCHENER, 2004; MONATH, 2001; QUARESMA *et al.*, 2013).

Caso o paciente não se recupere no período de remissão, inicia-se o período de intoxicação, que acomete aproximadamente 15 a 25% dos pacientes, onde a febre amarela se manifesta em uma forma mais grave, apresentando febre hemorrágica e comprometimento de órgãos. Essa fase é caracterizada pelos sinais clínicos de insuficiência hepática e renal. Quando não há recuperação durante o estágio de intoxicação, o paciente não sobrevive à infecção (MONATH, 2001; QUARESMA *et al.*, 2013).

No Brasil, a dengue se tornou endêmica com surtos anuais desde uma grande epidemia urbana no estado do Rio de Janeiro em 1986. Por se tratar de outra infecção *Flaviviridae* transmitida pelos mesmos mosquitos *A. aegypti* que transmitem a febre amarela, os surtos anuais da dengue corroboram para o aumento do risco de reintrodução da febre amarela urbana (MASSAD *et al.*, 2003).

Não há tratamento antiviral disponível para febre amarela, sendo a vacinação o método de maior eficiência para prevenir surtos da doença em áreas de risco. A vacina contra a febre amarela foi desenvolvida utilizando uma amostra de um paciente chamado Asibi, que sobreviveu à doença em Gana no ano de 1927. A cepa 17D foi atenuada por 176 passagens em série em culturas de tecido de camundongos e embriões de galinha. A cepa 17D originou duas sub linhagens, 17D-204 e 17DD que são atualmente utilizadas para a produção da vacina contra a febre amarela. A sublinhagem 17DD foi utilizada em 1937 pela primeira vez no Brasil. A produção ocorre através da inoculação do vírus 17DD em ovos de galinha embrionados seguindo os padrões determinados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (GARDNER; RYMAN, 2010; MANSO *et al.*, 2015).

A febre amarela silvestre acomete pessoas não imunizadas contra a doença que residem ou viajam para regiões em que a doença é endêmica (MANSO *et al.*, 2015). Entre janeiro e maio de 2019, foi realizado monitoramento da situação epidemiológica da febre amarela no Brasil, onde 1.281 casos foram notificados, 82 foram confirmados. Nesse período foram confirmados 14 óbitos (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2019).

A vacina da febre amarela atenuada é segura e confere proteção a longo prazo quando administrada em seu público alvo. Porém, há algumas desvantagens como as restrições de administração para alguns grupos de pessoas e raros eventos adversos causados pela vacinação. Assim, este trabalho visa compilar em uma revisão os principais estudos para o desenvolvimento de vacinas alternativas à atual.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Realizar revisão da literatura científica sobre o tema “Métodos alternativos à produção da vacina contra a febre amarela”, apontando seus princípios de produção, vantagens, desvantagens e fases de desenvolvimento.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- ✓ Descrever o modelo atual da vacina contra a febre amarela;
- ✓ Avaliar os efeitos adversos graves causados pela vacina;
- ✓ Identificar possíveis novos métodos de produção da vacina contra a febre amarela;
- ✓ Apresentar os princípios de produção, fases de desenvolvimento, vantagens e desvantagens destes novos métodos.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 METODOLOGIA

Foi realizada pesquisa bibliográfica com levantamento de dados da literatura científica do período de 2001 a 2021, utilizando também bibliografias de anos anteriores que se demonstraram fundamentais ao presente estudo.

Este levantamento bibliográfico foi realizado por meio de buscas por documentação indireta, no período de março a maio de 2021, utilizando os bancos de dados, LILACS, SCOPUS, *Pubmed* e *Scientific Electronic Library Online* (Scielo), utilizando as seguintes palavras-chave com ou sem combinações entre si, tanto em português como em inglês: *Febre amarela, vacina contra a febre amarela, produção de vacina, segurança vacinal*. Além dos artigos encontrados nos bancos de dados, também foram consultados teses, livros, revistas e sites.

Após breve leitura, como critério de exclusão, foram desconsiderados artigos que não se aplicavam ao tema e que se repetiam nas diferentes bases de dados.

### 2.2 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 2.2.1 Febre amarela: aspectos gerais

A febre amarela é uma arbovirose não contagiosa causada por um vírus do gênero *Flavivirus*, pertencente à família *Flaviridae*, mesma família do vírus da dengue, da zika, da febre do Nilo do Oeste que são responsáveis por causar epidemias nos últimos anos. No ano de 1927, o vírus da febre amarela foi isolado por Adrian Stokes, através de uma amostra de um paciente chamado Asibi, atribuindo seu nome à cepa viral (LITVOC; NOVAES; LOPES, 2018).

A doença ocorre com maior frequência em áreas rurais próximas a florestas, quando há presença de pessoas não vacinadas que adentraram em áreas com vírus circulante (VASCONCELOS, 2003). Os surtos que surgem a partir da infecção de indivíduos não vacinados em áreas próximas a florestas gera preocupação com a possibilidade de introdução do vírus em áreas urbanas, pois o controle da doença nestas áreas apresenta maiores dificuldades (GARSKE *et al.*, 2014). Casos de febre amarela ressurgiram nas últimas décadas nas regiões Central, Sul e Sudeste do

Brasil, causando um surto da doença fora da área endêmica, onde a população não estava vacinada (MONATH; VASCONCELOS, 2015).

A notificação de casos confirmados ou sob suspeita de febre amarela é mais frequente entre os meses de dezembro e maio. Homens na faixa etária entre 15-35 anos representam cerca de 80% dos casos notificados, o que retrata maior exposição deste grupo às áreas de floresta onde há vírus circulante (LITVOC; NOVAES; LOPES, 2018).

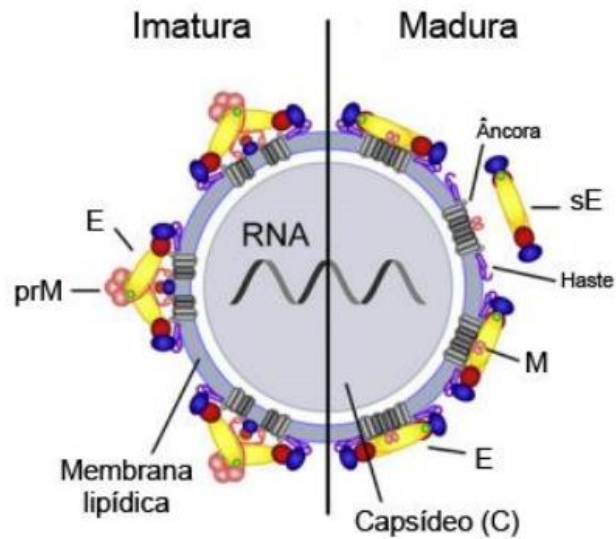
No ano de 2015, teve início um surto de febre amarela na Angola, chegando na República Federativa do Congo no primeiro trimestre de 2016. Os surtos de febre amarela foram controlados em ambos os países através de campanhas de emergência. A grande demanda por vacinas esgotou o estoque global. Com o apoio de especialistas em vacinas da Organização Mundial da Saúde (OMS), foi utilizada um quinto de uma dose regular da vacina contra a febre amarela para proteger o maior número de pessoas (FIOCRUZ, 2017d). Em 2018, nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia, foi adotado como estratégia o fracionamento da dose (1/5 da dose convencional) (LITVOC; NOVAES; LOPES, 2018). Pesquisas indicam que a dose fracionada induz a produção de anticorpos neutralizantes de modo similar à dose usual. Um estudo realizado em Bio-Manguinhos indica que a dose fracionada proporciona proteção por oito anos (MARTINS *et al.*, 2018; OMS, 2017).

### **2.2.2 O vírus da febre amarela**

O vírus da febre amarela possui material genético RNA de fita simples e polaridade positiva (Figura 2). Seu genoma contém cerca de 10.8 kb, com as regiões do extremo 5' e 3' em uma única fase aberta de leitura que codifica três proteínas estruturais que constituem a partícula viral (capsídeo (C), membrana (M) e envelope (E)), e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Essas proteínas fazem parte da maquinaria de replicação viral (Figura 3) (HEINZ; STIASNY, 2012).

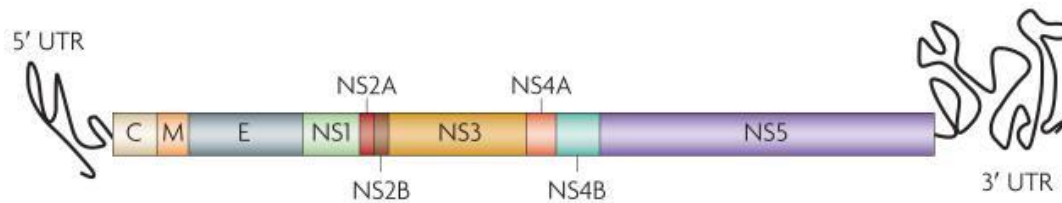
As proteínas estruturais atuam na montagem e na estrutura da partícula viral. Em contrapartida, as não estruturais participam da replicação do RNA, processamento dos polipeptídeos e montagem de partículas. O ciclo de replicação viral tem início quando há o contato do vírus com a superfície celular, mediado pela proteína E atra-

**Figura 2 – Esquema estrutural de um flavivírus.**



Fonte: Adaptado de HEINZ; STIASNY, 2012.

**Figura 3 – O genoma viral de um flavivírus.**



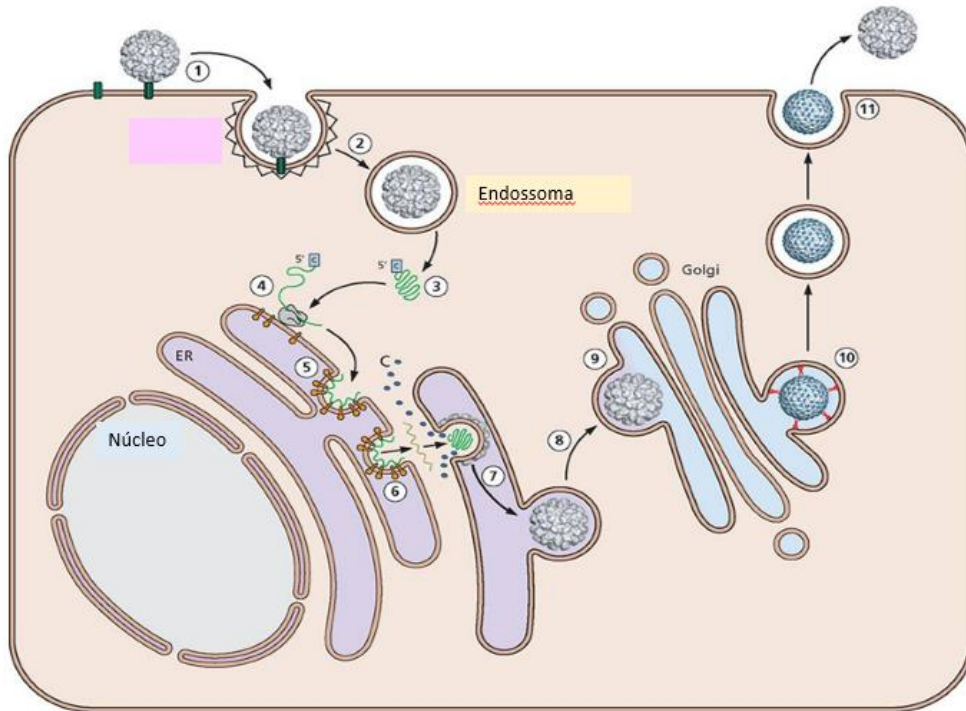
Fonte: GUZMAN *et al.*, 2010.

vés de endocitose mediada por receptores. No compartimento endossomal ocorre a fusão da membrana com o envelope viral, devido ao baixo pH, ocorrendo a liberação do RNA viral no citoplasma. A tradução do RNA viral ocorre em uma poliproteína que é processada por proteases virais e celulares, iniciando a produção de proteínas para a síntese da fita complementar negativa, que atua como intermediário replicativo, agindo como molde para síntese de novas fitas positivas. As novas partículas virais (não infecciosas) são montadas em associação com o retículo endoplasmático (RE). No complexo de Golgi ocorre a maturação das partículas virais, com a clivagem da proteína prM, restando apenas o peptídeo M, tornando-a uma partícula infecciosa. Em seguida, as vesículas intracelulares transportam as partículas virais até a



membrana celular, ocorrendo a liberação por exocitose (Figura 4) (SAMPATH; PADMANABHAN, 2009; SMIT *et al.*, 2011).

**Figura 4 — O ciclo de replicação de um flavivírus.**



Legenda: Ciclo replicativo do *Flavivírus*. 1- Ligação ao receptor celular mediada por endocitose; 2 - Fusão à membrana celular; 3- liberação do RNA no citoplasma; 4 -Tradução do RNA viral em poliproteína; 5 - As proteínas NS virais recrutam o genoma viral para um compartimento de replicação, que consiste em vesículas de membrana do retículo endoplasmático (RE) abertas para o citoplasma; 6 - Replicação do RNA viral; 7 - Montagem do virion no retículo endoplasmático (RE); 8 - As partículas virais imaturas recém-formadas são transportadas para a superfície celular pela via secretora; 9 - Maturação do virion no complexo de Golgi e clivagem da prM pela furina na rede trans-golgi (TNG); 10 - Partículas virais maduras são transportadas para a superfície celular em vesículas; 11 - Fusão da vesícula à membrana plasmática e liberação de novas partículas por exocitose.

Fonte: Adaptado de FLINT *et al.*, 2020.

### 2.2.3 A vacina atenuada para febre amarela FA17DD

A primeira vacina contra a febre amarela, a chamada “vacina francesa”, foi desenvolvida em 1932, por Andrew Sellards, da Universidade de Harvard e Jean Laigret, do Instituto Pasteur (MONATH, 2011). Essa vacina foi capaz de controlar a febre amarela na África nas décadas de 40 e 50. Entretanto, ela apresentava muitos efeitos neurotrópicos por conta de seu método de atenuação do vírus, que era realizado através de passagens em cérebro de ratos.

Em 1936, Max Theiler desenvolveu a cepa vacinal 17D a partir da cepa Asibi, o vírus foi atenuado por passagens em embriões de aves (com a remoção de cérebro e medula espinhal) (BARRETT, 2017; MONATH, 2011). Henrique de Azevedo Penna contribuiu para o desenvolvimento e produção da vacina da febre amarela aperfeiçoando a produção e elevando a segurança da vacina, pois introduziu o sistema de lote-semente, padronizando a produção, proporcionando a potência adequada da vacina e reduzindo eventos adversos. Este sistema foi posteriormente utilizado por todos os produtores em todo mundo, tanto da vacina de febre amarela, quanto das demais vacinas (FIOCRUZ, 2017a). Três subtipos da cepa do vírus (originárias da cepa Asibi), são utilizados atualmente: 17D-204, 17D-213 e 17DD. A diferença entre eles consiste nos distintos processos de passagem viral até alcançar a cepa vacinal (VERMA *et al.*, 2014).

Os países produtores da vacina contra a febre amarela no mundo são França, Estados Unidos, China, Senegal, Rússia e Brasil. E apenas quatro países (França, Senegal, Rússia e Brasil) estão pré-qualificados pela OMS, o que permite a exportação de vacinas (BARRETT, 2016). Na Tabela 1 estão correlacionadas as subcepas com as instituições fabricantes. O Brasil é o maior produtor de vacina contra a febre amarela no mundo, milhões de doses são produzidas anualmente por Bio-Manguinhos/Fiocruz (FIOCRUZ, 2017a). O ciclo silvestre da doença não pode ser erradicado, sendo assim, a vacinação é o melhor método de prevenção para os moradores e viajantes de áreas onde há notificação de casos suspeitos de febre amarela (FIOCRUZ, 2017b).

**Tabela 1 — Produtores mundiais da vacina contra a febre amarela.**

SUBCEPA	PAÍS	INSTITUIÇÃO
17D-204	Estados Unidos	Sanofi Pasteur
17D-204	China	Instituto Wuhan de Produtos Biológicos
17D-204	Senegal	Instituto Pasteur
17D-204	França	Sanofi Pasteur
17D-213	Rússia	Instituto Chumakov
17DD	Brasil	Bio-Manguinhos

Fonte: BARRETT, 2016.

No Brasil, a produção da vacina contra a febre amarela utiliza a subcepa 17DD, de maneira oposta aos demais produtores, que fazem uso da subcepa 17D-204. As subcepas anteriormente citadas diferem em 10 aminoácidos (MARCHEVSKY *et al.*, 2003).

A vacina atenuada 17D é uma medida de intervenção profilática bem sucedida no controle das epidemias de febre amarela. Ao longo das décadas de aplicação da vacina contra a febre amarela, foram estabelecidas sua eficácia e segurança (1.255 relatos de reações adversas em 333 milhões de doses aplicadas) (STAPLES *et al.*, 2015).

A vacina não é recomendada para as pessoas de grupos específicos, como gestantes e lactantes, pois a presença do vírus atenuado na composição pode ocasionar efeitos relacionados a doença de forma branda, afetando também o bebê (FIOCRUZ, 2019); pacientes que apresentam deficiências no sistema imunológico (transplantados, pacientes em quimioterapia, pacientes com AIDS) devido ao risco de desenvolvimento de efeitos adversos graves ocasionados pela vacinação (FIOCRUZ 2018a), pessoas com mais de 60 anos, bebês com menos de nove meses e alérgicos a ovos, devido às reações que pode causar (FIOCRUZ, 2017c).

O método de produção da vacina atenuada contra a febre amarela 17DD consiste na inoculação do lote semente do vírus vacinal 17DD em ovos embrionados de galinha livre de patógenos específicos no nono dia de desenvolvimento. Os ovos são incubados a 37,8 °C com umidade entre 55 % e 60 % até o décimo segundo dia de desenvolvimento. Após o período de incubação, é realizada a coleta dos embriões. Estes embriões são triturados, centrifugados, o sobrenadante é reservado, envasado a granel, liofilizado e distribuído junto à ampola com diluente (BENCHIMOL, 2001).

#### **2.2.4 Resposta imunológica**

As vacinas possuem partes atenuadas ou inativadas de um determinado antígeno, o que estimula uma resposta imunológica do corpo. A versão atenuada não causará a doença no indivíduo vacinado, mas irá promover uma resposta imune semelhante a reação do organismo ao verdadeiro agente patogénico. As vacinas de vírus atenuado promovem imunidade humoral e celular, fornecendo proteção ao longo da vida com uma única dose. A aplicação de uma única dose da vacina contra febre amarela estimula uma resposta imune, através da modulação de citocinas e

quimiocinas como IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2 e MIP1b. (AKONDY *et al.*, 2009; OMS, 2020). Ao longo dos anos, a imunização contra a febre amarela é capaz de produzir alto título de anticorpos, sendo por esta razão, a dose única ter sido recomendada pela OMS, entretanto estudos relatam que não só a resposta humoral, como também a resposta celular via TCD8 estaria envolvida na proteção após a aplicação da vacina (AKONDY *et al.*, 2009; OMS, 2013).

O vírus vacinal 17D ativa múltiplas células dendríticas via receptores semelhantes a Toll (“Toll-like receptors”, TLR) 2, 7, 8 e 9, ocasionando uma resposta imune. A interação do vírus com diferentes TLRs modifica o equilíbrio de citocinas Th1 e Th2 produzido pelas células ativadas. O incitamento de TLR 2 promove a via Th2, enquanto que a estimulação dos TLRs 7, 8 e 9 favorecem a via Th1 (GAUCHER *et al.*, 2008). As células dendríticas amadurecem após o reconhecimento do patógeno via TLR, em seguida migram para as áreas ricas em células T nos linfonodos drenantes da região, onde ocorre a apresentação do antígeno para estimulação da resposta adaptativa e memória imunológica (QUEREC *et al.*, 2006).

### **2.2.5 Efeitos adversos graves causados pela vacina FA17DD**

Os efeitos adversos associados à vacina atenuada FA17DD são leves na maioria das vezes em que ocorrem. Se manifestam cerca de 3-7 dias pós imunização atingem de 3-20% dos indivíduos vacinados e incluem reações locais e sistêmicas moderadas, que podem ser ocasionadas devido a ativação de células T e liberação de citocinas, incluindo interferons do tipo I e TNF- $\alpha$  durante o período de viremia (MONATH, 2012).

Alguns raros casos de eventos adversos graves estão associados a vacinas de febre amarela produzidas mundialmente, como por exemplo a doença viscerotrópica (*Vaccine Associated viscerotropic disease* (YEL-AVD)) e a doença neurotrópica (*Vaccine Associated neurotropic disease* (YEL-AND)) (BARRETT; TEUWEN, 2009). A doença viscerotrópica é derivada da replicação do vírus vacinal em diversos tecidos, causando uma falência sistêmica febril de múltiplos órgãos acometendo recém vacinados que não tenham imunidade prévia para febre amarela (BARNETT, 2007; MONATH, 2012). O surgimento dos sintomas ocorre entre três e oito dias, período similar ao de incubação do vírus selvagem. A YEL-AVD evolui assim como a doença natural, com sintomas iniciais como, febre alta, artralgia, mialgia e dor de cabeça. A

doença progride de forma rápida com elevação das enzimas hepatocelulares, hipotensão, falência respiratória e renal. Análises imunohistoquímica dos tecidos aponta propagação do vírus em diversos órgãos como o fígado, linfonodos, pulmões, baço, coração, músculo liso e cérebro. Fatores genéticos do hospedeiro podem estar relacionados com a manifestação da doença. Algumas limitações em mecanismos da resposta imune inata podem estar relacionadas ao quadro de viremia observado na YEL-AVD, estimulando a resposta inflamatória sistêmica comum da doença viscerotrópica (BARRETT *et al.*, 2007; HAYES, 2007; MONATH, 2012).

A doença neurotrópica acomete comumente recém vacinados e ocorre entre 2-30 dias pós vacinação. A doença pode se desenvolver de formas distintas, como síndrome de Guillain-Barré, meningoencefalite, onde há invasão do vírus vacinal ao sistema nervoso central, manifestações autoimunes, onde anticorpos ou células T produzidas através da resposta à vacina causam danos nos nervos centrais e periféricos, ao reagirem de maneira cruzada com epítopos neuronais. Casos de YEL-AND são incomuns e casos de morte causados pela doença são raros (1-2%) (MONATH, 2012; PEREIRA *et al.*, 2015).

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Métodos alternativos de produção

Embora a vacina da febre amarela apresente eficácia e segurança, há raros e graves eventos adversos após a vacinação. Além disto, a vacina não é recomendada para crianças com idade inferior a nove meses, adultos com mais de 59 anos de idade (somente é recomendada se residirem ou forem se deslocar para áreas com transmissão ativa da febre amarela), gestantes, indivíduos imunossuprimidos ou pessoas alérgicas aos componentes do ovo presente na formulação da vacina (FIOCRUZ, 2017a).

Atualmente há estudos em andamento com o objetivo de produzir um novo imunizante contra a febre amarela que seja mais eficaz e seguro, com menos efeitos adversos. Algumas características dos novos candidatos à vacina estão descritas na Tabela 2. Entre os métodos alternativos de produção de vacinas que estarão presentes nessa revisão, estão as vacinas inativadas e as vacinas de subunidade.

Tabela 2 — Aspectos gerais das novas vacinas candidatas contra a febre amarela.

VACINA CANDIDATA	PLATAFORMA	ESTRATÉGIA	FABRICANTE	FASE DE DESENVOLVIMENTO
XRX-001	Inativada	Inativação do vírus com B-propiolactona.	Xcellerex, GE Healthcare, PnuVax	Fase I Concluída
PI/YFE	DNA	Expressão da proteína do envelope de comprimento total de febre amarela associada ao sinal de proteína de membrana lisossomal 1 (LAMP-1).	Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)	Pré-clínica
Pyf17D-16	DNA de imunização (i-DNA)	Combina a imunização de DNA e a eficácia das vacinas atenuadas vivas	Medigen	Pré-clínica
MVA-BN-YF	Vetor viral	MVA atenuado, não replicante que expressa proteína do envelope do vírus da febre amarela.	Bavarian Nordic & National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)	Fase I

Fonte: ZURBIA-FLORES *et al.*, 2021.

### 2.3.1.1 Vacina inativada: cultura de células como plataforma de produção viral

O desenvolvimento de vacinas inativadas está relacionado as implicações acerca de limitações de uso e segurança da vacina atenuada FA17D. Uma forma de reduzir os riscos de eventos adversos graves associados a vacina atenuada seria o uso da vacina inativada com aplicação de reforço com a vacina atenuada FA17D (HAYES, 2010). Na produção de vacinas inativadas é necessário realizar a inativação completa do vírus infeccioso, para garantir a segurança da vacina e fazer a retenção de epítomos virais essenciais após a inativação, para obtenção de uma alta qualidade de antígeno (PEREIRA *et al.*, 2015).

Gaspar e colaboradores (2008) realizou a inativação do vírus FA17DD por pressão hidrostática. O vírus perdeu a capacidade de infectar camundongos, porém provocou baixo nível de titulação de anticorpos neutralizantes. Os resultados obtidos no estudo, fundamentaram o desenvolvimento de uma vacina inativada por pressão contra a febre amarela (GASPAR *et al.*, 2008).

Um estudo realizado por Monath e colaboradores (2011), utilizou cultura de células como plataforma de produção viral para realizar testes com a vacina do vírus FA17D-204. As partículas virais foram obtidas em cultura de células Vero, em seguida sendo inativadas quimicamente com  $\beta$ -propiolactona. Duas doses da vacina foram administradas durante o teste clínico. Essas doses continham um adjuvante que induziu a produção de anticorpos neutralizantes em títulos superiores ao mínimo preconizado para proteção em 90% das pessoas avaliadas. Foi visto que 12 meses após a aplicação da última dose, a presença de anticorpos neutralizantes ainda era observada em 83% das pessoas envolvidas no estudo.

Em 2015, outro estudo foi realizado utilizando novamente a cultura de células Vero como plataforma de produção. Neste estudo, foi utilizado o vírus vacinal (FA17DD) inativado, onde três doses da vacina contendo adjuvante foram necessárias para induzir a produção de anticorpos neutralizantes e conferir proteção (Tabela 3) (PEREIRA *et al.*, 2015).

**Tabela 3 — Sobrevivência de camundongos C57BL/6 imunizados com a vacina inativada e infectados pelo vírus 17DD no dia 42.**

INÓCULO	NÚMERO DE DOSES	NÚMERO DE ANIMAIS	PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA (VIVO/TOTAL)
17DD inativado	1	12	0% (0/12)
17DD + Al (OH) 3 inativado	1	12	0% (0/12)
17DD inativado	2	12	8,3% (1/12)
17DD + Al (OH) 3 inativado	2	12	41,7% (5/12)
17DD inativado	3	12	16,7% (2/12)
17DD + Al (OH) 3 inativado	3	12	100% (12/12)
Vacina atenuada	1	12	100% (12/12)

Fonte: PEREIRA *et al.*, 2015.

A baixa concentração de antígenos virais (2 g / dose) da vacina inativada contendo adjuvante foi capaz de induzir 100% de proteção (após três doses) em animais posteriormente infectados pelo vírus 17DD. Perspectivas futuras apontam que o aumento da concentração e a substituição do adjuvante poderia diminuir o número

de doses necessárias e induzir maiores respostas humorais e celulares (PEREIRA *et al.*, 2015).

As vacinas inativadas possuem um fator de segurança, pois não ocorre a multiplicação do agente após a sua aplicação. Entretanto, esse tipo de vacina induz uma imunidade de menor duração, sendo necessária doses de reforço ao longo dos anos para promover a duração da imunidade (SCHATZMAYR, 2003). Quando comparada com a vacina atenuada, a vacina inativada apresenta menor imunogenicidade, porém sua estrutura permite apresentação de epítomos quaternários relatados como principais alvos de anticorpos neutralizantes para flavivírus (VRATSKIKH *et al.*, 2013). Uma das vantagens deste método é a redução do risco de reações alérgicas associadas a proteínas do ovo e gelatina, devido ao cultivo em células.

#### 2.3.1.2 Vacinas de DNA

O uso de vacinas de DNA que codificam proteínas do vírus da febre amarela vem sendo investigado. Uma vacina de DNA que compreende a proteína envelope de comprimento completo (prME) fundida ao sinal de proteína de membrana 1 (LAMP-1), após a aplicação de três doses, foi capaz de proteger os camundongos de um desafio letal através da indução de respostas de células T e altos títulos de anticorpos neutralizantes. Entretanto, em comparação com os anticorpos neutralizantes induzidos pela vacina atenuada contra a febre amarela, os títulos induzidos pelo candidato foram inferiores (MACIEL *et al.*, 2015).

Uma outra vacina de DNA baseada na expressão do genoma de comprimento total da cepa atenuada viva 17D da febre amarela foi avaliada. Este candidato utiliza a tecnologia “DNA de imunização” (i-DNA®) para lançar vírus atenuado em receptores, sendo assim, há a combinação das vantagens da plataforma de vacinas de DNA com a eficácia das vacinas atenuadas. Nos testes em camundongos, foi observada a soroconversão de todos os animais após 21 dias da aplicação da vacina em dose única. Os títulos de anticorpos neutralizantes em camundongos vacinados com i-DNA® foram superiores ou equivalentes aos vacinados com a vacina FA17D. O potencial desta plataforma de vacina ainda exige maiores investigações em outros modelos animais, como em PNH's para análise da imunogenicidade, eficácia e o perfil



de segurança, e assim avaliar as suas possíveis aplicações em seres humanos (PUSHKO *et al.*, 2016; TRETAKOVA *et al.*, 2014).

#### 2.3.1.3 Vacina de vetor viral: MVA-BN-YF

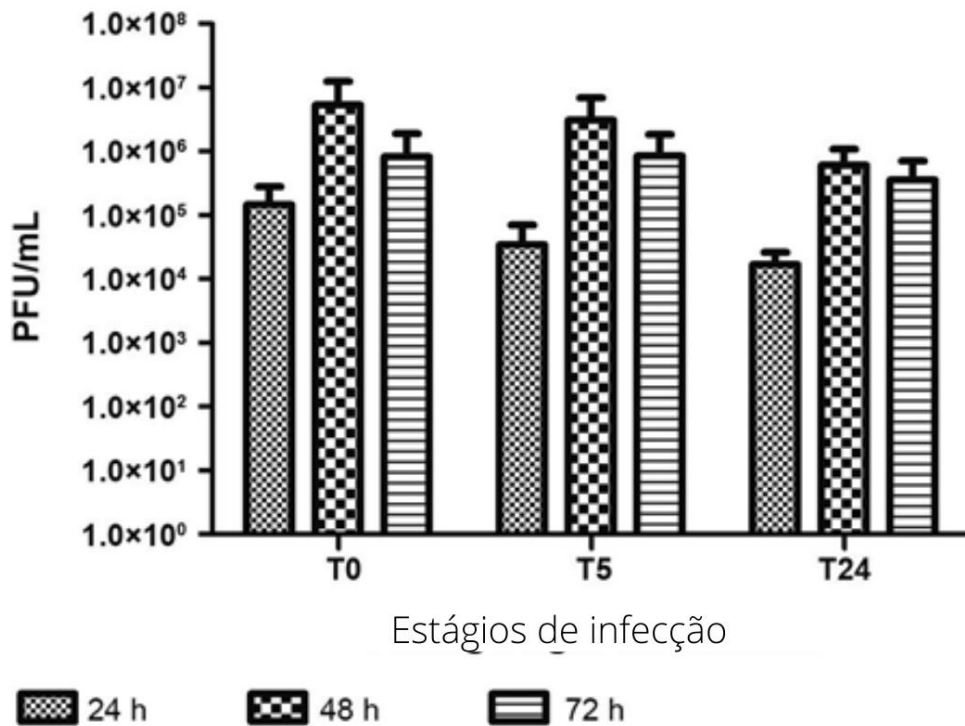
O vírus da vaccinia modificado Ankara (MVA), um vírus da varíola não replicante, tem sido utilizado como uma plataforma de vacinas para fornecer diversos antígenos de forma segura. O candidato à vacina MVA-BN-YF gerou uma resposta protetora em hamsters infectados com vírus da febre amarela de forma semelhante à proteção gerada pela vacina 17D. Os níveis de anticorpos neutralizantes observados em animais imunizados, eram similares no teste com ou sem uso de adjuvante (JULANDER *et al.*, 2018). Apesar dos resultados obtidos em ensaios clínicos fase I, não foram fornecidas informações sobre avanços para ensaios de fase II. Embora a vacina MVA seja eficaz e segura, este candidato exige doses de reforço para atribuir proteção, o que o torna inadequado como substituto para a vacina contra a febre amarela utilizada atualmente.

#### 2.3.1.4 Aplicação do modelo de cultura muscular esquelética para desenvolvimento de um potencial candidato a vacina

Souza e colaboradores (2019) analisaram a infecção de células musculares esqueléticas de embriões de galinha pelo vírus da febre amarela 17DD através de experimentos *in vivo* e *in vitro*. Foram utilizadas células musculares das regiões do peito e perna dos embriões de galinha não infectados de onze dias de idade. As células foram expostas ao vírus FA17DD. Foram realizados quatro pontos de infecção: T0 (semeadura), T5, T24 e T120 (após infecção). Foi observada a produção de partículas virais infecciosas em células musculares na cultura infectada em estágios distintos de diferenciação. As células musculares de embrião de galinha infectadas em 0,1 multiplicidade de infecção (MOI) em estágio de plaqueamento (T0), após 5 h (T5), e após 24 h (T24) foram avaliadas 24, 48 e 72 hpi tituladas utilizando a técnica de ensaio da unidade de formação de placas (PFU) (Figura 5).

Os resultados obtidos no estudo mostraram que as células musculares esqueléticas do embrião de galinha são capazes de sustentar a produção de vírus da febre amarela, inicialmente em pequena escala. Sendo assim, é necessário aprimorar

Figura 5 — Titulação por PFU em diferentes estágios de diferenciação.



Fonte: SOUZA *et al.*, 2019.

este processo de produção para aumentar a capacidade de produção de partículas virais por células musculares na cultura. O modelo de cultura muscular esquelética apresenta um padrão de infecção similar ao observado *in vivo*, isto sugere que este modelo de infecção é adequado para estudos sobre do vírus da febre amarela, sendo também um possível candidato para o desenvolvimento de vacina (SOUZA *et al.*, 2019).

#### 2.3.1.5 Vacina de subunidade utilizando *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa que pertence à família *Enterobacteriaceae*. Devido ao seu fácil cultivo, baixos custos e altos rendimentos, a *E. coli* é o micro-organismo mais amplamente utilizado para a produção de proteínas heterólogas (TRIPATHI, 2016). Uma das desvantagens nesse sistema é a obtenção da alta concentração da proteína de interesse na forma de agregados (corpúsculos de inclusão). Porém, esses agregados podem ser purificados através de alguns métodos como lavagem com lisozima e solubilização com uso de

Triton X-100. A proteína recombinante NS1 do vírus da dengue (alvo para diagnóstico, pois está presente abundantemente no sangue durante a fase aguda da doença) foram obtidas com sucesso através do uso de métodos de purificação (AMORIM, 2010; SINGH; PANDA, 2005).

Diversos estudos buscam candidatos à vacina anti-flavivírus à base de proteínas produzidas em *E. coli*, utilizando diferentes adjuvantes ou estratégias. Tosta e colaboradores (2021) aplicaram ferramentas de bioinformática para desenvolver uma vacina contra a febre amarela multiepítopo baseada na sequência de genoma de 137 cepas de vírus da febre amarela com o propósito de desenvolver uma vacina alternativa e mais segura. A proposta é reduzir os custos de produção através da produção da proteína recombinante em *E. coli*. Entretanto, é necessário mais análises experimentais para validar a eficácia dessa vacina.

#### 2.3.1.6 Vacina de subunidade: expressão em plataforma vegetal

As vacinas de subunidade são promissoras para o desenvolvimento de novas vacinas, pois consistem em um ou mais epítomos ou proteínas antigênicas (RIGANO; WALMSLEY, 2005). As vacinas de subunidade podem ser baseadas em diferentes plataformas de produção. Trata-se de uma proposta mais segura para uso, quando comparada às vacinas atenuadas e inativadas, visto que no seu processo de produção não há presença de vírus replicativo, descartando a possibilidade reações adversas causadas pelo vírus e atenuação ou inativação ineficaz (MARTÍNEZ; GIULIETTI; TALOU, 2012).

A proteína E, presente na estrutura do vírus da febre amarela, está associada a diversos estágios de infecção celular, como: ligação mediada por receptores, fusão, penetração na membrana celular, montagem e brotação. A proteína E tornou-se um foco no desenvolvimento de vacinas de subunidade para febre amarela, pois ela auxilia na obtenção de anticorpos neutralizantes por vírus e na produção da imunidade protetora (TOTTEY *et al.*, 2018).

As plantas possuem um potencial para produção em larga escala de proteínas recombinantes, de maneira rápida, para variadas aplicações de produtos, incluindo vacinas subunidades e anticorpos monoclonais (YUSIBOV *et al.*, 2013). O sistema vegetal possui candidatos a vacinas estão em estágios clínicos ou avançados de desenvolvimento. Além disso, há um produto aprovado para comercialização pela

*Food and Drug Administration* dos EUA: a taliglucerase alfa (Protalix BioTherapeutics Inc., Carmiel, Israel). Algumas vantagens apresentadas por esse sistema é o menor custo (a produção necessita apenas de luz solar, água, dióxido de carbono e minerais); maior segurança, pois não há risco de contaminação por toxinas bacterianas, patógenos animais e solventes, e produção de grande quantidade de antígenos vacinais em curto período de tempo (CHICHESTER; YUSIBOV, 2007). A cultura de células vegetais fornece vantagens como crescimento sob condições controladas, facilidade de purificação e aprovação por agências regulatórias (MARTÍNEZ; GIULIETTI; TALOU, 2012).

Um estudo realizado por Tottey e colaboradores (2018) demonstrou resultados onde a proteína E recombinante expressa em plantas *Nicotiana benthamiana* estimulou respostas de anticorpos neutralizantes de vírus em camundongos e primatas não humanos (PNHs), protegendo mais de 70% dos camundongos imunizados de um quadro infeccioso de febre amarela. Esse estudo indicou o potencial do antígenos de subunidades da proteína E para uso no desenvolvimento de uma vacina não infecciosa contra a febre amarela. Entretanto, quando realizadas duas ou três imunizações desses antígenos de proteína E na presença de Alhydrogel (adjuvante) em camundongos ou PNHs, não foram apresentados resultados de imunogenicidade equivalente e eficácia protetora a uma vacina de 17DD atenuada viva. Sendo assim, são necessárias investigações futuras, como a exploração de diferentes adjuvantes e uma avaliação imunológica detalhada antes do desenvolvimento de um candidato à vacina de subunidade baseado em proteína E produzido em *N. benthamiana*.

#### 2.3.1.7 Vacina de subunidade: expressão em baculovírus

Os baculovírus fazem parte de um grupo de vírus de genoma DNA fita dupla circular super enovelado, podendo variar de tamanho entre 80 a 180 kb (ROHRMANN, 2013). Os vírus da família *Baculoviridae* estão classificados em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV), de acordo com seu potencial de formar corpos de oclusão ou grânulos durante o processo de infecção celular. Entre os hospedeiros alvo dos tipos de baculovírus, há os insetos, como por exemplo traças e borboletas. Isto estimula o uso de alguns baculovírus como pesticidas e controle biológico (HU, 2005).

O uso de baculovírus como sistema de expressão de proteínas recombinantes em células de inseto é baseado em seu potencial de realizar alterações pós-traducionais, elevada capacidade de inserção de genes por conta de seu genoma grande e flexível e alto rendimento. Além disto, o fato de não infectarem humanos de maneira natural, a biossegurança torna-se um fator importante para sua aplicação. O cultivo de células de inseto é menos complexo, sendo realizado em frascos “*shakers*” sem exigir atmosfera de CO<sub>2</sub> para sua manutenção, cultivo em meio livre de soro, o que reduz os custos. Uma desvantagem deste sistema é o processo de glicosilação, que é um processamento pós-traducional presente em todos os eucariotos, podendo haver alterações nas interações da proteína com outras moléculas, solubilidade e meia-vida devido a inserção de açúcares que varia conforme a espécie de inseto (HU, 2005; KOLLEWE; VILCINSKAS, 2013).

Um estudo realizado por Barros *et al.* (2011) utilizou um baculovírus recombinante em células de inseto contendo o gene envelope da cepa vacinal 17D do vírus da febre amarela. Os resultados confirmaram, através de microscopia de fluorescência, a expressão da proteína E recombinante nas células de insetos infectadas por baculovírus recombinante. Essa proteína E é antigenicamente similar à proteína selvagem e pode ser útil para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade, além de auxiliar no diagnóstico específico da doença, visto que é reconhecida por anticorpos monoclonais e policlonais usados para detectar infecção pelo vírus da febre amarela no ser humano, o que otimiza o controle de surtos através da diminuição dos casos subnotificados.

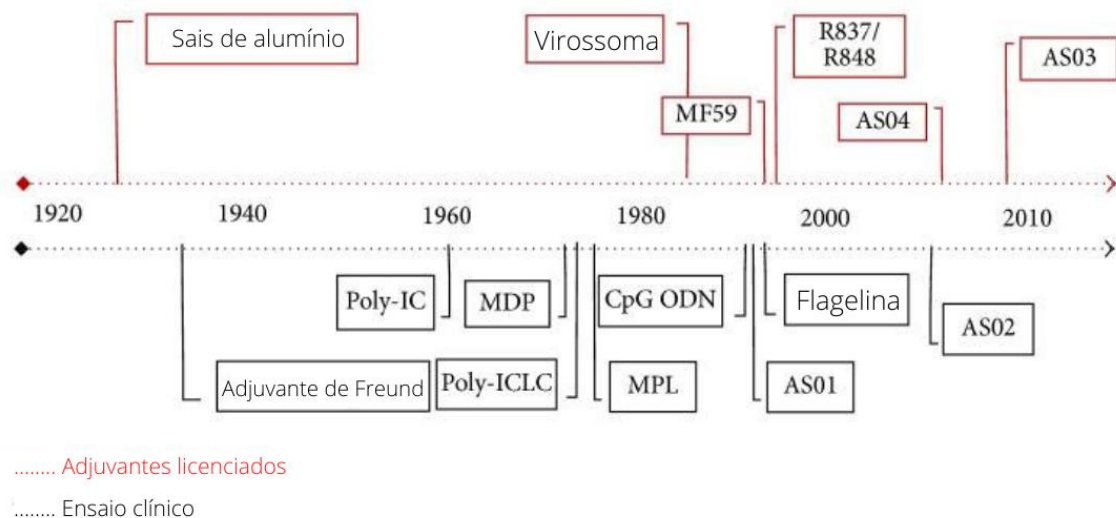
#### 2.3.1.8 Adjuvantes

A limitação na imunogenicidade das vacinas de subunidades sugere a necessidade de desenvolver novos adjuvantes com o objetivo de modular as respostas imunes específicas do antígeno (ARAÚJO *et al.*, 2020). A escolha do adjuvante ideal deve se basear no mínimo de reações tóxicas locais e sistêmicas que ele é capaz de causar, deve ser biodegradável, de menor custo e simples fabricação. Existem duas classificações principais para os adjuvantes: sistemas carreadores particulados e substâncias imunoestimulatórias. Adjuvantes particulados atuam como carreadores e podem ser de diferentes materiais como sais de alumínio, emulsões

óleo-em-água, entre outros. Esses adjuvantes estimulam respostas pró inflamatórias locais, ativando a resposta imune inata (GUPTA; SIBAER, 1995; PEREZ *et al.*, 2012).

Em vacinas, os adjuvantes interagem com o sistema imunológico e elevam a potência dos antígenos vacinais. Desenvolvido em 1926 por Glenny e Pope, o alumínio foi o primeiro adjuvante aplicado em vacinas humanas (BRITO; O'HAGAN, 2014), posteriormente diversos adjuvantes foram descobertos (Figura 6). Os adjuvantes baseados em sais de alumínio são compostos de precipitados de fosfato de alumínio ou hidróxido de alumínio, aos quais o antígeno é adsorvido. Esse tipo de adjuvante possui potencial para formar depósitos de antígeno, oferecendo longa duração com liberação lenta e exposição prolongada. Sais de alumínio também são capazes de induzir morte celular por necrose, liberando moléculas como o ácido úrico, conhecidas como padrão molecular associado a perigo (“DAMP”, do inglês “*danger associated molecular pattern*”) (PEREZ *et al.*, 2012; DE GREGORIO *et al.*, 2013).

**Figura 6 — Linha do tempo da descoberta de adjuvantes de vacinas.**



Fonte: Adaptado de APOSTÓLICO *et al.*, 2016.

Diversos adjuvantes imunoestimuladores têm como alvo elementos de via de sinalização da imunidade inata, em especial TLR, receptores de RIG-I (receptores genes indutíveis de ácido retinóico) e receptores de Lectina do tipo C, que agem para formar uma primeira linha de defesa contra microrganismos, através da interação com padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Dos agonistas de TLR, o MPL

(*monofosforil lipid A*) é o único aprovado para uso em humanos até o momento. O MPL foi desenvolvido para promover a produção de citocinas. Este adjuvante estimula respostas do tipo Th1 pois induz a produção de IL-12 e IFN $\gamma$  (DE GREGORIO *et al.*, 2013; APOSTÓLICO *et al.*, 2016).

Um estudo de revisão realizado por Reed, Orr e Fox (2013) descreveu os potenciais benefícios dos adjuvantes na composição de vacinas atuais e futuras e descreveu a importância da formulação e dos mecanismos de ação dos adjuvantes. Para selecionar o melhor adjuvante para fazer parte da composição de uma vacina, deve-se considerar alguns fatores como a patologia para qual se destina a vacina, rota de infecção da doença e público alvo. Sendo assim, é necessário uma avaliação precisa da resposta imunológica promovida pelas formulações vacinais compostas por adjuvantes. A toxicidade é o principal fator que limita o licenciamento de alguns adjuvantes.

#### 2.3.1.9 Vacina combinada: vírus quimérico de febre amarela

Um procedimento realizado para produzir anticorpos contra dengue, utiliza os genes do vírus da dengue e introduzem no vírus vacinal da febre amarela. A vacina contra a febre amarela é utilizada como base para combinações genéticas, atuando como um tipo de “plataforma”. Após um processo de ‘corte e cola’, são introduzidos genes dos vírus da dengue no vírus vacinal da febre amarela, que estimula a produção de anticorpos contra a dengue (FIOCRUZ, 2014).

Baseado nessa abordagem de obtenção de vírus atenuados através da troca dos genes prM-E que compõe o envelope dos flavivírus, encontra-se em desenvolvimento em estágio avançado (fase 3) a ChimeriVax. Para o desenvolvimento desta vacina, foi utilizado o vírus vacinal da febre amarela, substituindo os genes prM-E pelos mesmos genes dos quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV). Os resultados obtidos dos testes utilizando essa vacina, demonstrou baixa proteção contra o sorotipo 2 (DENV-2), porém para o desenvolvimento de uma vacina contra dengue, é necessário que o candidato seja eficaz contra os quatro sorotipos da doença (BATISTA, 2016).

A recente epidemia de zika vírus (ZIKV) nas Américas, e os surtos de febre amarela no Brasil, resalta a importância de vacinas seguras e eficazes contra o ZIKV, como também a necessidade de elevar a capacidade de produção de vacina contra a

febre amarela. Um estudo realizado por Kum e colaboradores (2020) demonstrou que a vacina quimérica zika YF-ZIKprM/E (não possui o envelope glicoproteína do vírus da febre amarela) protege totalmente os camundongos (AG129) contra o vírus da febre amarela sem provocar anticorpos neutralizantes específicos do vírus.

A atual pandemia de Covid-19 demandou o desenvolvimento de vacinas eficazes, seguras e de rápida ação. Tornou-se necessário realizar o aproveitamento de diversas plataformas de vacinas para uma resposta emergencial. Um estudo realizado por Sanchez e colaboradores (2021) descreveu o desenvolvimento de uma vacina candidata para síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2). A candidata YF-S0 foi produzida utilizando a vacina contra a febre amarela atenuada 17D (FA17D) como vetor para expressar um modelo de pré-fusão do antígeno de pico SARS-CoV-2. A segurança, imunogenicidade e a eficácia da vacina foram avaliadas utilizando diversos modelos animais. A candidata YF-S0 demonstrou resultados satisfatórios no perfil de segurança e também induziu altos níveis de anticorpos neutralizantes SARS-CoV-2 em *hamsters* (*Mesocricetus auratus*), *camundongos* (*Mus musculus*) e PNH's cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Além disso, esse candidato conferiu imunidade protetora contra o vírus da febre amarela. Em um modelo de hamster e em macacos, a YF-S0 preveniu a infecção com SARS-CoV-2. Além disso, uma única dose foi capaz de proteger a maioria dos hamsters vacinados em apenas 10 dias, impedindo o desenvolvimento de doenças pulmonares. Portanto, o desenvolvimento deste possível candidato à vacina contra SARS-CoV-2, pode ser justificado por seu bom desencadeamento de resposta imunológica e a proteção alcançada rapidamente após imunização com uma única dose.

### **2.3.2 Vantagens e desvantagens dos métodos de produção de vacinas**

As vacinas são fundamentais no combate a doenças infecciosas, além de ser alvo de estudos que demonstram resultados promissores na prevenção e tratamento de câncer e doenças autoimunes. A formulação de uma vacina é comumente composta de um patógeno vivo atenuado ou morto, que podem ser administradas por via oral ou injetadas. A produção em massa de vacinas, para atender a demanda, requer tempo e um alto custo, o que provoca obstáculos no controle epidemias e surtos de doença (YUSIBOV, 2011). Por fim, a Tabela 4 apresenta a comparação das vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de produção de vacinas.



**Tabela 4 — Vantagens e desvantagens dos métodos de produção de vacinas.**

SISTEMAS DE PRODUÇÃO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
<b>Vacina Atenuada</b>	Mimetiza infecção natural Imunidade duradoura Melhor imunidade celular Altas taxas de soroconversão	Desenvolvimento da doença Eventos adversos
<b>Vacinas Inativadas ou de Subunidade</b>	Estabilidade Segurança	Imunidade de curta duração Requer reforços frequentes
<b>Vacinas de DNA</b>	Estabilidade em temperatura Fabricação simples	Requer reforços

Fonte: A autora, 2020.

A febre amarela é uma doença que pode acometer diversos órgãos vitais em sua forma grave, fazendo com que a vacinação seja imprescindível nas regiões onde a doença é endêmica. Embora a vacina da febre amarela apresente eficácia e segurança, há raros e graves eventos adversos após a vacinação.

Apesar de apresentarem menor imunogenicidade que a vacina atualmente utilizada, as vacinas subunidades são capazes de oferecer maior segurança, podendo ser os candidatos preferidos de antígeno para grupos de risco anteriormente citados. Essas vacinas também poderiam ser utilizadas como uma abordagem mais segura onde são combinadas com vacinas atenuadas no processo de imunização. As vacinas inativadas citadas anteriormente, não produzem imunidade duradoura, sendo necessária a aplicação de doses de reforço, o que reduz a viabilidade de grandes campanhas de vacinação, pois requer mais visitas às unidades de saúde. A imunização em dose única é fundamental para reduzir os riscos de aumento dos surtos da doença e prevenir o esgotamento do estoque da vacina.

O presente trabalho abordou algumas estratégias estudadas nos últimos anos para desenvolver métodos alternativos para produção de vacinas alternativas a atualmente utilizada na prevenção contra febre amarela. Uma nova estratégia para a produção da vacina se torna ainda mais relevante uma vez que o vírus FA17DD funciona como plataforma de produção para outras vacinas.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no amplo conteúdo recrutado para elaboração desse trabalho, é possível concluir que nos últimos anos houve um aumento na preocupação com relação aos eventos adversos graves causados pela vacinação utilizando o modelo atual FA17DD. Isto estimula a pesquisa e desenvolvimento de métodos alternativos à produção da vacina contra a febre amarela. As graves reações adversas, somadas às restrições do público alvo da vacinação contra a febre amarela, contribuem para a busca por alternativas que possam complementar ou substituir a versão atualmente utilizada na prevenção da doença.

Desenvolver uma vacina alternativa que seja tão segura e eficaz quanto o modelo atual continua sendo um desafio, pois a vacina FA17DD promove proteção a longo prazo com apenas uma dose, o que é vantajoso para países em desenvolvimento. Além disso, a possibilidade de desenvolver uma vacina que possa ser capaz de imunizar contra mais de um flavivirus também pode promover um benefício significativo.

Desta forma, é necessário avançar nos estudos para o desenvolvimento de uma vacina alternativa, que seja segura para todos os indivíduos, de qualquer idade, sob variadas condições de saúde, promovendo uma proteção durável e robusta.

As informações aqui apresentadas compilaram estudos realizados nos últimos anos acerca dos métodos alternativos para produção de um novo imunizante contra febre amarela que possua eficiência e segurança, bem como seus princípios de produção e fase de desenvolvimento, podendo corroborar em estudos futuros.

## REFERÊNCIAS

- AKONDY, Rama S.; MONSON, Nathan D.; MILLER, Joseph D.; EDUPUGANTI, Srilatha; TEUWEN, Dirk; WU, Hong; QUYYUMI, Farah; GARG, Seema; ALTMAN, John D.; RIO, Carlos del. The Yellow Fever Virus Vaccine Induces a Broad and Polyfunctional Human Memory CD8+ T Cell Response. **The Journal Of Immunology**, v. 183, n. 12, p. 7919-7930, 23 nov. 2009. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0803903>.
- AMORIM, Jaime Henrique; PORCHIA, Bruna F.M.M.; BALAN, Andrea; CAVALCANTE, Rafael C.M.; COSTA, Simone Morais da; ALVES, Ada Maria de Barcelos; FERREIRA, Luís Carlos de Souza. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in Escherichia coli preserves structural and immunological properties of the native protein. **Journal Of Virological Methods**, v. 167, n. 2, p. 186-192, ago. 2010. Elsevier BV.
- APOSTÓLICO, Juliana de Souza; LUNARDELLI, Victória Alves Santos; COIRADA, Fernanda Caroline; BOSCARDIN, Silvia Beatriz; ROSA, Daniela Santoro. Adjuvants: classification, modus operandi, and licensing. **Journal Of Immunology Research**, v. 2016, p. 1-16, 2016.
- ARAÚJO, Sergio C.; PEREIRA, Lennon R.; ALVES, Rubens P. S.; ANDREATA-SANTOS, Robert; KANNO, Alex I.; FERREIRA, Luis Carlos S.; GONÇALVES, Viviane M. Anti-Flavivirus Vaccines: review of the present situation and perspectives of subunit vaccines produced in escherichia coli. **Vaccines**, v. 8, n. 3, p. 492, 31 ago. 2020.
- BARNETT, E. D. Yellow Fever: epidemiology and prevention. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 6, p. 850-856, 15 mar. 2007.
- BARRETT, Alan D.T.; HIGGS, Stephen. Yellow Fever: a disease that has yet to be conquered. **Annual Review of Entomology**, v. 52, n. 1, p. 209-229, jan. 2007.
- BARRETT, Alan Dt; TEUWEN, Dirk e. Yellow fever vaccine—how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 3, p. 308-313, jun. 2009.
- BARRETT, Alan D.T. Yellow Fever in Angola and Beyond — The Problem of Vaccine Supply and Demand. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 4, p. 301-303, 28 jul. 2016.
- BARRETT, Alan D.T. Yellow fever live attenuated vaccine: a very successful live attenuated vaccine but still we have problems controlling the disease. **Vaccine**, v. 35, n. 44, p. 5951-5955, out. 2017.
- BARROS, Maria Ces; GALASSO, Tatiane Gcm; CHAIB, Antônio Jm; DEGALLIER, Nicolas; NAGATA, Tatsuya; RIBEIRO, Bergmann M. Yellow fever virus envelope protein expressed in insect cells is capable of syncytium formation in lepidopteran cells and could be used for immunodetection of YFV in human sera. **Virology Journal**, v. 8, n. 1, p. 261, 2011.

BATISTA, I.C. A. Desenho e produção de proteínas quiméricas potencialmente aplicáveis no desenvolvimento de testes diagnóstico e/ou vacinas para a febre Dengue. 2016. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Concentração Biologia Celular e Molecular). Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. 2016

BECK, Andrew; GUZMAN, Hilda; LI, Li; ELLIS, Brett; TESH, Robert B.; BARRETT, Alan D. T. Phylogeographic Reconstruction of African Yellow Fever Virus Isolates Indicates Recent Simultaneous Dispersal into East and West Africa. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, p. 1910, 14 mar. 2013.

BENCHIMOL, Instituto de Tecnologia em imunobiologicos. febre amarela a doença e a vacina, uma historia inacabada. Instituto de Tecnologia em imunobiologicos; p. 237-273, 2001.

BRITO, Luis A.; O'HAGAN, Derek T.. Designing and building the next generation of improved vaccine adjuvants. **Journal Of Controlled Release**, v. 190, p. 563-579, set. 2014. Elsevier BV.

CHICHESTER, Jessica A.; YUSIBOV, Vidadi. Plants as Alternative Systems for Production of Vaccines. **Human Vaccines**, v. 3, n. 4, p. 146-148, jul. 2007.

DE GREGORIO E, CAPRONI E, ULMER JB. Vaccine adjuvants: mode of action. **Front Immunol**; 4:214, jul. 2013

FLINT, JANE; RACANIELLO, VINCENT R.; RALL, GLENN F.; HATZIOANNOU, THEODORA; SKALKA, ANNA MARIE. Principles of Virology (ASM Books) (Locais do Kindle 22486-22499). Wiley. Edição do Kindle.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Vacina que conjuga duas técnicas pode revelar caminho inovador contra a dengue. Portal Fiocruz 27 nov. 2014. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/vacina-que-conjuga-duas-tecnicas-pode-revelar-caminho-inovador-contradengue> Acesso em: 10 jan. 2021

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). História e qualidade: produção da vacina contra febre amarela na Fiocruz. Portal Fiocruz, 17 jan. 2017a. Disponível em: História e qualidade: produção da vacina contra febre amarela na Fiocruz Acesso em: 9 dez. 2020.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). FIOCRUZ contribui para imunização contra febre amarela. Portal FIOCRUZ, 17 jan. 2017b. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/fiocruz-contribui-para-imunizacao-contrafebre-amarela> Acesso em: 30 dez. 2020.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Febre amarela: Ministério da Saúde orienta sobre dose única da vacina. Portal Fiocruz, 11 abr. 2017c. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/febre-amarela-ministerio-da-saude-orienta-sobredose-unica-da-vacina> Acesso em: 9 dez. 2020.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Angola e República Democrática do Congo declaram fim do surto de febre amarela. BioFiocruz, 15 feb. 2017d. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/noticias/1404-angola-e>

republica-democratica-do-congo-declaram-fim-do-surto-de-febre-amarela. Acesso em: 1 jun. 2021.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Há risco na vacinação de pessoas com problemas imunológicos?. Portal FIOCRUZ, 26 jan. 2018a. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/pergunta/ha-risco-na-vacinacao-de-pessoas-com-problemas-imunologicos> Acesso em: 30 dez. 2020.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Dose fracionada da vacina para febre amarela garante imunidade prolongada. Portal Fiocruz, 24 mai. 2018b. Disponível em <https://portal.fiocruz.br/noticia/dose-fracionada-da-vacina-para-febre-amarela-garante-imunidade-prolongada> Acesso em: 10 dez. 2020.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Gestantes podem tomar a vacina contra febre amarela?. Portal Fiocruz 25 out. 2019. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/pergunta/gestantes-podem-tomar-vacina-contra-febre-amarela> Acesso em: 15 dez. 2020.

GASPAR, Luciane P.; MENDES, Ygara S.; YAMAMURA, Anna M.y.; ALMEIDA, Luiz F.C.; CARIDE, Elena; GONÇALVES, Rafael B.; SILVA, Jerson L.; OLIVEIRA, Andréa C.; GALLER, Ricardo; FREIRE, Marcos S. Pressure-inactivated yellow fever 17DD virus: implications for vaccine development. **Journal Of Virological Methods**, v. 150, n. 1-2, p. 57-62, jun. 2008. Elsevier BV.

GARDNER, Christina L.; RYMAN, Kate D. Yellow Fever: a reemerging threat. **Clinics In Laboratory Medicine**, v. 30, n. 1, p. 237-260, mar. 2010. Elsevier BV.

GARSKE, Tini; VAN KERKHOVE, Maria D.; YACTAYO, Sergio; RONVEAUX, Olivier; LEWIS, Rosamund F.; STAPLES, J. Erin; PEREA, William; FERGUSON, Neil M. Yellow Fever in Africa: estimating the burden of disease and impact of mass vaccination from outbreak and serological data. **Plos Medicine**, v. 11, n. 5, p. 1-17, 6 maio 2014.

GAUCHER, Denis; THERRIEN, René; KETTAF, Nadia; ANGERMANN, Bastian R.; BOUCHER, Geneviève; FILALI-MOUHIM, Abdelali; MOSER, Janice M.; MEHTA, Riyaz S.; DRAKE, Donald R.; CASTRO, Erika. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. **Journal Of Experimental Medicine**, v. 205, n. 13, p. 3119-3131, 1 dez. 2008.

GUIRAKHOO, F.; WELTZIN, R.; CHAMBERS, T. J.; ZHANG, Z.-X.; SOIKE, K.; RATTERREE, M.; ARROYO, J.; GEORGAKOPOULOS, K.; CATALAN, J.; MONATH, T. P. Recombinant Chimeric Yellow Fever-Dengue Type 2 Virus Is Immunogenic and Protective in Nonhuman Primates. **Journal Of Virology**, v. 74, n. 12, p. 5477-5485, 15 jun. 2000.

GUPTA, Rajesh K.; SIBER, George R. Adjuvants for human vaccines—current status, problems and future prospects. **Vaccine**, v. 13, n. 14, p. 1263-1276, jan. 1995.

GUZMAN, Maria G.; HALSTEAD, Scott B.; ARTSOB, Harvey; BUCHY, Philippe; FARRAR, Jeremy; GUBLER, Duane J.; HUNSPERGER, Elizabeth; KROEGER, Axel;

MARGOLIS, Harold S.; MARTÍNEZ, Eric. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 7-16, dez. 2010.

HAYES, Edward B. Acute viscerotropic disease following vaccination against yellow fever. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 101, n. 10, p. 967-971, out. 2007.

HEINZ, F.X.; STIASNY, Karin. Flaviviruses and their antigenic structure. **Journal Of Clinical Virology**, v. 55, n. 4, p. 289-295, dez. 2012.

HU, Yu-Chen. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 4, p. 405-416, abr. 2005.

JULANDER, J. G.; TESTORI, M; CHEMINAY, C; VOLKMANN, A. Immunogenicity and Protection After Vaccination With a Modified Vaccinia Virus Ankara-Vectored Yellow Fever Vaccine in the Hamster Model. **Frontiers In Immunology**, v. 9, 2 ago. 2018.

KITCHENER, S. Viscerotropic and neurotropic disease following vaccination with the 17D yellow fever vaccine, ARILVAX®. **Vaccine**, v. 22, n. 17-18, p. 2103-2105, jun. 2004.

KOLLEWE, C. VILCINSKAS, A. PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS IN INSECT CELLS. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 255-271, 1 mar. 2013.

KUM, Dieudonné Buh; BOUDEWIJNS, Robbert; MA, Ji; MISHRA, Niraj; SCHOLS, Dominique; NEYTS, Johan; DALLMEIER, Kai. A chimeric yellow fever-Zika virus vaccine candidate fully protects against yellow fever virus infection in mice. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 520-533, 1 jan. 2020.

LITVOC, Marcelo Nóbrega; NOVAES, Christina Terra Gallafrio; LOPES, Max Igor Banks Ferreira. Yellow fever. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 2, p. 106-113, fev. 2018.

MACIEL, Milton; CRUZ, Fábila da Silva Pereira; CORDEIRO, Marli Tenório; MOTTA, Márcia Archer da; CASSEMIRO, Klécia Marília Soares de Melo; MAIA, Rita de Cássia Carvalho; FIGUEIREDO, Regina Célia Bressan Queiroz de; GALLER, Ricardo; FREIRE, Marcos da Silva; AUGUST, Joseph Thomas. A DNA Vaccine against Yellow Fever Virus: development and evaluation. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, 13 abr. 2015.

MANSO, Pedro Paulo de Abreu; OLIVEIRA, Barbara C. E. P. Dias de; SEQUEIRA, Patrícia Carvalho de; SOUZA, Yuli Rodrigues Maia de; FERRO, Jessica Maria dos Santos; SILVA, Igor José da; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; GUEDES, Priscila Tavares; SANTOS, Alexandre Araujo Cunha dos; FREIRE, Marcos da Silva. Yellow Fever 17DD Vaccine Virus Infection Causes Detectable Changes in Chicken Embryos. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 0004064, 15 set. 2015. Public Library of Science (PLoS). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4570825/> Acesso em: 10 dez. 2020.

MARCHEVSKY, Renato s; FREIRE, Marcos s; COUTINHO, Evandro S.F; GALLER, Ricardo. Neurovirulence of yellow fever 17DD vaccine virus to rhesus monkeys. **Virology**, v. 316, n. 1, p. 55-63, nov. 2003.

MARTÍNEZ, C.A.; GIULIETTI, A.M.; TALOU, J. Rodríguez. Research advances in plant-made flavivirus antigens. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1493-1505, nov. 2012.

MARTINS, Reinaldo de Menezes; MAIA, Maria de Lourdes S.; LIMA, Sheila Maria Barbosa de; NORONHA, Tatiana Guimarães de; XAVIER, Janaina Reis; CAMACHO, Luiz Antonio Bastos; ALBUQUERQUE, Elizabeth Maciel de; FARIAS, Roberto Henrique Guedes; CASTRO, Thalita da Matta de; HOMMA, Akira. Duration of post-vaccination immunity to yellow fever in volunteers eight years after a dose-response study. **Vaccine**, v. 36, n. 28, p. 4112-4117, jun. 2018. Elsevier BV.

MASSAD, Eduardo; BURATTINI, Marcelo Nascimento; COUTINHO, Francisco Antonio Bezerra; LOPEZ, Luiz Fernandes. Dengue and the risk of urban yellow fever reintroduction in São Paulo State, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 4, p. 477-484, ago. 2003.

MONATH, Thomas P. Yellow fever: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 11-20, ago. 2001.

MONATH, Thomas P. Yellow Fever Vaccines: The Success of Empiricism, Pitfalls of Application, and Transition to Molecular Vaccinology. **In History of Vaccine development**, p. 109–135, 2011

MONATH Thomas P. Review of the risks and benefits of yellow fever vaccination including some new analyses. **Expert Rev Vaccines**. (4): 427-48, Apr. 2012

MONATH, Thomas P.; FOWLER, Elizabeth; JOHNSON, Casey T.; BALSER, John; MORIN, Merribeth J.; SISTI, Maggie; TRENT, Dennis W. An Inactivated Cell-Culture Vaccine against Yellow Fever. **New England Journal Of Medicine**, v. 364, n. 14, p. 1326-1333, 7 abr. 2011.

MONATH, Thomas P.; VASCONCELOS, Pedro F.C. Yellow fever. **Journal Of Clinical Virology**, v. 64, p. 160-173, mar. 2015.

PEREIRA, Renata C.; SILVA, Andrea N.M.R.; SOUZA, Marta Cristina O.; SILVA, Marlon V.; NEVES, Patrícia P.C.C.; SILVA, Andrea A.M.V.; MATOS, Denise D.C.s.; HERRERA, Miguel A.O.; YAMAMURA, Anna M.y.; FREIRE, Marcos S. An inactivated yellow fever 17DD vaccine cultivated in Vero cell cultures. **Vaccine**, v. 33, n. 35, p. 4261-4268, ago. 2015.

PÉREZ, O.; BATISTA-DUHARTE, A.; GONZÁLEZ, E.; ZAYAS, C.; BALBOA, J.; CUELLO, M.; CABRERA, O.; LASTRE, M.; SCHIJNS, V.e.J.C. Human prophylactic vaccine adjuvants and their determinant role in new vaccine formulations. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 45, n. 8, p. 681-692, ago. 2012.

PLOTKIN, Stanley A.. Increasing Complexity of Vaccine Development. **Journal Of Infectious Diseases**, v. 212, n. 1, p. 12-16, 26 jun. 2015.

PUSHKO, Peter; LUKASHEVICH, Igor S.; WEAVER, Scott C.; TRETYAKOVA, Irina. DNA-launched live-attenuated vaccines for biodefense applications. **Expert Review Of Vaccines**, v. 15, n. 9, p. 1223-1234, 25 abr. 2016.

QUARESMA, Juarez A. S.; PAGLIARI, Carla; MEDEIROS, Daniele B. A.; DUARTE, Maria I. S.; VASCONCELOS, Pedro F. C.. Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. **Reviews In Medical Virology**, v. 23, n. 5, p. 305-318, 22 jul. 2013.

QUEREC, Troy; BENNOUNA, Soumaya; ALKAN, Sefik; LAOUAR, Yasmina; GORDEN, Keith; FLAVELL, Richard; AKIRA, Shizuo; AHMED, Rafi; PULENDRAN, Bali. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. **Journal Of Experimental Medicine**, v. 203, n. 2, p. 413-424, 6 fev. 2006.

REED, Steven G; ORR, Mark T; FOX, Christopher B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nature Medicine**, v. 19, n. 12, p. 1597-1608, dez. 2013

RIGANO, M Manuela; WALMSLEY, Amanda M. Expression systems and developments in plant-made vaccines. **Immunology & Cell Biology**, v. 83, n. 3, p. 271-277, jun. 2005.

ROHRMANN, G. F. Baculovirus Molecular Biology [internet] (3rd ed.). National Center for Biotechnology Information (US), 2013.

SANCHEZ-FELIPE, L. *et al.* A single-dose live-attenuated YF17D-vectored SARS-CoV-2 vaccine candidate. **Nature**, v. 590, n. 7845, p. 320-325, 1 dez. 2020.

SAMPATH, Aruna; PADMANABHAN, R.. Molecular targets for flavivirus drug discovery. **Antiviral Research**, v. 81, n. 1, p. 6-15, jan. 2009

SCHATZMAYR, Hermann G.. Novas perspectivas em vacinas virais. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 10, n. 2, p. 655-669, 2003.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (Brasil). Monitoramento de Febre Amarela Brasil 2019. Secretaria de Vigilância em Saúde, [S. l.], p. 1-8, 9 jun. 2019. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/13/Informe-de-Monitoramento-de-Febre-Amarela-Brasil--n-18.pdf> Acesso em: 10 dez. 2020

SINGH, Surinder Mohan; PANDA, Amulya Kumar. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 303-310, abr. 2005.

SMIT, Jolanda; MOESKER, Bastiaan; RODENHUIS-ZYBERT, Izabela; WILSCHUT, Jan. Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. **Viruses**, v. 3, n. 2, p. 160-171, 22 fev. 2011.

SOUZA, Y. R. M. *et al.* Generation of Yellow Fever virus vaccine in skeletal muscle cells of chicken embryos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, e190187, 2019.

STAPLES, J. E. *et al.* "Yellow Fever Vaccine Booster Doses: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, 2015." **MMWR. Morbidity and mortality weekly report** v. 64,23: 647-50, 2015.



TOSTA, S. F. O. *et al.* Multi-epitope based vaccine against yellow fever virus applying immunoinformatics approaches. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, n. 1, p. 219-235, 6 jan. 2020.

TRETYAKOVA, I. *et al.* Plasmid DNA initiates replication of yellow fever vaccine in vitro and elicits virus-specific immune response in mice. **Virology**, v. 468-470, p. 28-35, nov. 2014.

TRIPATHI, Nagesh K.. Production and Purification of Recombinant Proteins from *Escherichia coli*. **ChemBioeng Reviews**, v. 3, n. 3, p. 116-133, 12 maio 2016.

TOTTEY, S. *et al.* Plant-Produced Subunit Vaccine Candidates against Yellow Fever Induce Virus Neutralizing Antibodies and Confer Protection against Viral Challenge in Animal Models. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 2, p. 420-431, 7 fev. 2018

VASCONCELOS, P. F. C. Febre amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século xxi e o risco da reurbanização. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 244-258, dez. 2002.

VASCONCELOS, Pedro Fernando da Costa. Febre amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 275-293, abr. 2003.

VERMA, Ramesh; KHANNA, Pardeep; CHAWLA, Suraj. Yellow fever vaccine. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 10, n. 1, p. 126-128, 20 set. 2013

VRATSKIKH, O. *et al.* Dissection of Antibody Specificities Induced by Yellow Fever Vaccination. **Plos Pathogens**, v. 9, n. 6, e1003458, 20 jun. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Annex 2: Requirements for yellow fever vaccine (Requirements for Biological Substances No. 3). **Technical Report Series**, n.º 872, p.30 – 68, 1998. Disponível em: [https://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/yellow\\_fever/en/](https://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/yellow_fever/en/)  
Acesso em: 10 dez. 2020

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO position on the use of fractional doses - June 2017, addendum to vaccines and vaccination against yellow fever WHO: Position paper - June 2013. **Vaccine**, 35(43), p 5751–5752, Jul. 2017

YUSIBOV, Vidadi; STREATFIELD, Stephen J.; KUSHNIR, Natasha. Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals: vaccines, antibodies and beyond. **Human Vaccines**, v. 7, n. 3, p. 313-321, mar. 2011.

YUSIBOV, V. *et al.* Hybrid Viral Vectors for Vaccine and Antibody Production in Plants. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 31, p. 5574-5586, 1 ago. 2013.

ZURBIA-FLORES, G. M.; ROLLIER, C. S.; REYES-SANDOVAL, A. Re-thinking yellow fever vaccines: fighting old foes with new generation vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, p. 1-9, 11 maio 2021.