

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Vacinas para a Estimulação da Imunidade ao Nível das Mucosas

Mara Sofia Sousa Fernandes

Monografia orientada pela Doutora Lúcia Maria Diogo Gonçalves, Investigadora
Principal

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2025

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Vacinas para a Estimulação da Imunidade ao Nível das Mucosas

Mara Sofia Sousa Fernandes

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentado à
Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia orientada pela Doutora Lídia Maria Diogo Gonçalves, Investigadora
Principal

2025

Declaração de cumprimento do Código de Conduta e de Boas Práticas da Universidade de Lisboa

Declaro ter desenvolvido e elaborado o presente trabalho em consonância com o Código de Conduta e de Boas Práticas da Universidade de Lisboa. Mais concretamente, afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de fraude académica, que aqui declaro conhecer, e que atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, assumindo na íntegra as responsabilidades da autoria.

Resumo

Uma das formas de controlo de doenças infecciosas são as vacinas, tendo como objetivo o alcance de um nível de cobertura suficiente para interromper a transmissão de agentes patogénicos.

Este estudo tem como objetivo o estudo das vacinas para a estimulação da imunidade ao nível das mucosas. É um estudo secundário com revisão narrativa e com utilização de diferentes tipos de documentos como, artigos científicos, teses ou dissertações, e *sites*.

As mucosas são a primeira linha de defesa contra agentes patogénicos, através da produção de IgA secretora desempenhando um papel fundamental na exclusão imunológica e neutralização de agentes infecciosos. A resposta imunológica ao nível das mucosas é essencial para a defesa que pode ser efetivamente estimulada por vacinas direcionadas a tecidos linfóides associados às mucosas. As diferentes vias de administração das mesmas apresentam como desvantagem a degradação enzimática.

A microbiota intestinal desempenha um papel fundamental na modulação da imunidade induzida por vacinas. A eficácia vacinal pode ser reduzida devido a enteropatias ambientais, desnutrição e em países menos desenvolvidos. O impacto da microbiota pode melhorar as taxas de resposta imunitária especialmente em crianças e populações vulneráveis.

De modo a melhorar a eficácia das vacinas são usados adjuvantes e sistemas de veiculação onde desempenham um papel importante na indução da resposta imune vacinal aumentando a imunogenicidade. Adjuvantes que atuam ao nível das mucosas como o quitosano, possuem propriedades mucoadesivas que facilitam a veiculação de antígenos e promovem respostas locais robustas. Sistemas de veiculação como as nanopartículas (NPs) oferecem proteção aos antígenos contra a degradação promovendo a sua libertação controlada. As NPs são sistemas de veiculação inovadores para vacinas. Estas têm propriedades que mimetizam os agentes patogénicos oferecendo respostas imunológicas mais robustas e direcionadas.

Atualmente, Portugal dispõe de vacinas ao nível das mucosas como, a vacina oral contra o rotavírus, para prevenção de gastroenterites e a vacina intranasal para a gripe. A vacina oral da poliomielite está atualmente em desuso tendo sido substituída por vacina injetável.

Em suma, as vacinas representam um avanço promissor no controle de doenças infecciosas, podendo transformar a saúde pública global. O seu desenvolvimento e acessibilidade são fundamentais para maximizar seus benefícios.

Palavras chave: Microbiota; mucosas; vacinas; adjuvantes; sistemas de veiculação.

Abstract

One of the methods for controlling infectious diseases is vaccination, aiming to achieve sufficient coverage to interrupt the transmission of pathogens.

This study focuses on vaccines that stimulate mucosal immunity. It is a secondary study with a narrative review, utilizing various types of documents such as scientific articles, theses, dissertations, and websites.

Mucosal surfaces serve as the first line of defense against pathogenic microorganisms by producing secretory IgA, playing a crucial role in immune exclusion and neutralization of infectious agents. Mucosal immune responses are essential for defense and can be effectively stimulated by vaccines targeting mucosa-associated lymphoid tissues. However, different administration routes present challenges, such as enzymatic degradation.

The gut microbiota plays a fundamental role in modulating vaccine-induced immunity. Vaccine efficacy may be reduced due to environmental enteropathies, malnutrition, and conditions in less developed countries. The impact of the microbiota can enhance immune response rates, especially in children and vulnerable populations.

To improve vaccine efficacy, adjuvants and delivery systems are used, playing an important role in enhancing immune responses and increasing immunogenicity. Mucosal adjuvants, such as chitosan, have mucoadhesive properties that facilitate antigen delivery and promote strong local immune responses. Delivery systems like nanoparticles (NPs) offer antigen protection against degradation while enabling controlled release. Nanoparticles are innovative vaccine delivery systems with properties that mimic pathogens, inducing more robust and targeted immune responses.

Currently, Portugal offers mucosal vaccines such as the oral rotavirus vaccine, which prevents gastroenteritis, and the intranasal influenza vaccine. The oral polio vaccine is no longer in use and has been replaced by an injectable vaccine.

In summary, vaccines represent a promising advancement in controlling infectious diseases and have the potential to transform global public health. Their development and accessibility are essential to maximizing their benefits.

Keyword: Microbiota; mucosal; vaccines; adjuvants; delivery systems.

Abreviaturas

γ -PGA - Poli(ácido gama-glutâmico)

AcMNPV - Vírus da poliedrose nuclear múltipla de *Autographa californica*

ALRs - Recetores do tipo AIM2

APCs - Células apresentadoras de antígenos

BALT - Tecido linfoide associado aos brônquios

cAMP- Adenosina cíclica monofosfato

BCG - Vacina contra a tuberculose

CT - Toxina da cólera

CTV - Comissão Técnica de Vacinação

CTLs - Células T citotóxicas

DAMPs - Indutores de padrões moleculares associados a danos

DDA - Dimetildioctadecilamônio

DGS - Direção-Geral da Saúde,

DCs - Células dendríticas

DIM - Doença invasiva meningocócica

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dsRNAs - RNAs de cadeia dupla sintéticos

fMetleuPhe - *N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine*

GALT- Tecido linfoide associado ao intestino

GEA - Gastreenterite aguda

GISAID - Iniciativa Global de Compartilhamento de Dados da *Influenza* Aviária

GLA - Glucopiranosil lipídeo A

GLA-AF -Suspensão aquosa de glucopiranosil lipídeo A

GLA-alum - Glucopiranosil lipídeo A com hidróxido de alumínio

GLA-LS - Lipossoma de glucopiranosil lipídeo A

GLA-SE- Emulsão estável de glucopiranosil lipídeo A

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HPV - Vírus do papiloma humano

IgA – Imunoglobulina A

IgE - Imunoglobulina E

IgG - Imunoglobulina G

IL - Interleucina

IM - Via Intramuscular

LPS - Lipopolissacarídeo bacteriano

LNPs - Nanopartículas lipídicas

LT - Enterotoxina termolábil

MALT - Tecidos linfoides associados à mucosa

MDP - Dipeptídeo muramílico

MHC - Complexos peptídeo-major de histocompatibilidade

MPL - Avridina, monofosforil lipídeo A

NALT - Tecido linfóide nasal

NK - Célula natural killer

NKT - Células T *natural killer*

NLRs - Recetores do tipo Nod

NPs - Nanopartículas

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

pIgR - Recetor Ig polimérico

PKA - Proteína quinase A

PIgA – IgA polimérica

PLA - Poli(ácido láctico)

PLGA - Poli(ácido láctico-co-glicólico)

PLG -Polímero poli (D, L-*lactídeo-co-glicólido*)

PNV - Programa nacional de vacinação

PRRs - Recetores de reconhecimento de padrões

RLRs - Recetores do tipo RIG-I,

Rna – Ácido ribonucleico

SC -Via subcutânea

SIDA - Síndrome da imunodeficiência adquirida

SIgA - Imunoglobulina A secretória

SIT - Imunoterapia específica para alérgenos

T $\gamma\delta$ - Células Gama/Delta T linfócitos

TED - Dendritos transepiteliais

Tdpa -Vacina Tosse Convulsa

TLRs - Recetores do tipo Toll

TNF - Fator de necrose tumoral

VLPs Partículas semelhantes a vírus

Índice:

1. Introdução.....	12
2. Objetivos	15
3. Materiais e métodos	15
4. Indução da resposta imune da mucosa	16
4.1 Papel dos anticorpos secretores na defesa contra infeções	17
5. Vias de administração e tipos de vacinas	21
5.1 Vias de administração	21
5.2 Tipos de vacinas.....	25
6. Adjuvantes da mucosa e sistemas de veiculação	28
6.1 Modos de ação em adjuvantes de vacinas ao nível das mucosas.....	29
6.2 Avanços recentes no desenvolvimento de vacinas e sistemas de veiculação	31
6.3 Fundamentos imunológicos para a busca por novos adjuvantes vacinais	38
6.4 Vacinas usando nanopartículas	40
7. Vacinas no mercado.....	46
8. Conclusão	50
9. Bibliografia.....	52

Índice de Figuras:

Figura 1 - Resposta imune da mucosa específica do antígeno	17
Figura 2 - Produção local de IgA secretora e IgM secretora	18
Figura 3 – Vacinas com e sem adjuvante	29
Figura 4: Classificação de adjuvantes baseada no modo de ação	30

Índice de Tabelas:

Tabela 1- Sistemas de veiculação	37
Tabela 2- Exemplos de antígenos utilizados em sistemas de veiculação de vacinas com NPs	44
Tabela 3- Vacinas recomendadas em Portugal	47

1. Introdução

No decorrer dos tempos tem-se tornado cada vez mais importante a imunização ao nível das mucosas de modo a obter um nível de cobertura suficiente para interromper a transmissão e propagação de microrganismos patogénicos. Uma das formas de controlo de doenças infecciosas são as vacinas. As vacinas têm um grande impacto no controlo de doenças infecciosas, tendo como objetivo o alcance de um nível de cobertura suficiente para interromper a transmissão de agentes patogénicos¹ A vacinação para além de ser eficaz no controlo e propagação de doenças infecciosas também, ajuda a reduzir causas de morbilidade e mortalidade. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2017), a vacinação previne mais de 2,5 milhões de mortes a cada ano em todo o mundo^{2,3}. As vacinas induzem proteção individual e podem proteger a população não vacinada reduzindo as taxas de transmissão pessoa a pessoa e limitando o risco de exposição individual^{3,4}.

A exposição a diferentes antígenos pode representar uma ameaça natural e pode estar presente durante o nosso ciclo de vida. Agentes potencialmente patogénicos como vírus, bactérias, parasitas e fungos, ou outro tipo de agentes, como pólenes, pelos de animais ou ácaros, podem desencadear no organismo uma resposta de anticorpos induzida por antígeno. De acordo com a sua natureza, os antígenos podem ser proteínas, glicoproteínas, carboidratos, lípidos e ácidos nucleicos⁵.

A superfície da mucosa representa uma grande área exposta de tecido fino que reveste os tratos respiratório, digestivo e geniturinário. Além de facilitar funções fisiológicas essenciais, como absorção de nutrientes e trocas gasosas atua, também, como uma barreira. A mucosa possui um sistema imunitário robusto que pode responder à exposição constante a antígenos e alérgenos de alimentos e microrganismos. Em mamíferos superiores, este sistema imunitário mucoso compreende a integração de uma rede imunológica composta por tecidos, células linfoides, células associadas à membrana mucosa, células mieloides e moléculas efetoras, como as citocinas, quimiocinas, peptídeos antimicrobianos e imunoglobulina A secretória (SIgA). O sistema imunitário associado às mucosas engloba sistemas inatos e adaptativos sofisticados. A parte inata do sistema imunitário associado às mucosas emprega uma variedade de mecanismos de modo a fornecer uma defesa de primeira linha, que podem ser elementos mecânicos, químicos e celulares^{6,7}.

Os elementos mecânicos do sistema imunitário associado às mucosas do sistema inato incluem uma barreira física de epitélio firmemente formado, complementada por uma camada de muco

e incluem recetores inatos, peptídeos antimicrobianos e enzimas, inibidores específicos de proteases e espécies reativas de oxigênio, que facilitam a eliminação dos agentes patogénicos através de opsonização ou respostas imunológicas mediadas por citocinas. Os elementos celulares compreendem células imunológicas inatas, como macrófagos, células dendríticas (DCs), mastócitos e células *natural killer* (NK). Estes tipos de células atuam diretamente nos agentes patogénicos por fagocitose, podendo, inclusivamente, iniciar vias de sinalização que promovem a destruição dos mesmos ao reconhecer estruturas conservadas^{6,7}. Esses mecanismos atuam nos níveis extra-epitelial, epitelial e subepitelial. Em geral, os compostos antimicrobianos atuam no nível extra-epitelial, enquanto as barreiras mecânicas, assim como, os recetores de reconhecimento padrão (que reconhecem padrões moleculares associados a agentes patogénicos altamente conservados) funcionam ao nível epitelial. No nível subepitelial, as células imunológicas inatas reconhecem os agentes patogénicos e moléculas microbianas que destroem as outras duas camadas do epitélio e utilizam uma cascata de citocinas e quimiocinas para recrutar células efetoras e desencadear respostas imunológicas adaptativas⁷.

Os agentes infecciosos desencadeiam uma doença sistémica após uma invasão bem-sucedida através da mucosa. Assim, a vacinação pela via das mucosas pode induzir imunidade de primeira linha que impede o estabelecimento e a propagação da infeção. A imunidade local gerada pela vacinação pela via das mucosas é deveras essencial para uma proteção eficaz contra infeções nas superfícies das mucosas, que normalmente são pouco permeáveis à transdução de anticorpos séricos ou à passagem passiva através do epitélio⁷.

Em Portugal, existe um plano nacional de vacinação (PNV) que teve início a 4 de outubro de 1965. Este programa teve como objetivo a diminuição da mortalidade infantil através de uma campanha massiva contra a poliomielite^{8,9}. A vacina oral de vírus atenuado contra a poliomielite surge em 1960 desenvolvida por *Albert B. Sabin*, onde desempenhou um papel fundamental na redução do número de casos¹⁰. Uma das vantagens desta vacina foi a sua facilidade de administração o que permitiu a vacinação em massa mesmo em áreas de difícil acesso. Mais tarde a vacina oral da poliomielite veio a ser substituída pela vacina inativa de poliovírus administrada por via intramuscular (IM), que ofereceu alta taxa de soroconversão, mas não induziu imunidade intestinal suficiente para prevenir a propagação do vírus no intestino. Assim sendo, apesar de ser eficaz na eliminação da poliomielite em países com altos padrões de higiene pode permitir a transmissão silenciosa do vírus¹¹.

A efetividade das vacinas foi comprovada pela erradicação da varíola em 1980, com a eliminação da poliomielite na Europa em 2022 e através do controlo de doenças como o sarampo, difteria, tétano neonatal sendo estas vacinas cobertas pelo PNV^{8,9}.

2. Objetivo

Este estudo tem como objetivo a pesquisa e aquisição de conhecimentos acerca das vacinas para a estimulação da imunidade ao nível das mucosas, bem como os seus adjuvantes, sistemas de veiculação e vias de administração.

3. Materiais e métodos

Este tipo de estudo é um estudo secundário, onde são utilizados estudos que já existem de modo a estabelecer conclusões a partir de estudos primários com um resumo dos dados encontrados, recorrendo a uma revisão narrativa¹², com diferentes tipos de documentos como por exemplo, artigos científicos, teses ou dissertações, e *sites* fidedignos encontrados através do motor de busca *Google*. Foram, inclusivamente, utilizados documentos contendo revisões bibliográficas e alguns trabalhos de campo obtidos através da plataforma *Pubmed*. Foram selecionados os estudos adequados de modo a cumprir com os objetivos do presente trabalho.

4. Indução da resposta imune da mucosa

A superfície mucosa consiste numa vasta área de tecido fino que reveste os tratos respiratório, digestivo e geniturinário. Tem como função facilitar funções fisiológicas importantes, absorção de nutrientes e realização de trocas gasosas. A mucosa possui um sistema imunitário robusto e pode responder à constante exposição a substâncias ambientais, incluindo antigénios e alergénios provenientes de alimentos e microrganismos. Nos mamíferos superiores, esse sistema imunitário associado à mucosa é a integração de uma rede imunológica composta por tecidos, células linfóides, células associadas à membrana mucosa, células mielóides e moléculas efetoras, como citocinas, quimiocinas, peptídeos antimicrobianos e a SIgA¹³.

A vacinação pelas vias tradicionais (oral, subcutânea (SC) e IM) é eficaz para induzir uma resposta imune a nível sistémico, mas tem dificuldade em gerar uma resposta imune específica ao antigénio nas superfícies mucosas. Deste modo, as vacinas que atuam ao nível das mucosas têm recebido especial atenção no controlo de agentes patogénicos que entram no organismo por estas vias. A imunização da mucosa resulta frequentemente na estimulação de respostas imunitárias tanto da mucosa como sistémica, enquanto a imunização sistémica tende a induzir apenas respostas sistémicas sem ativar o sistema imunitário da mucosa¹. As regiões das superfícies das mucosas, contêm uma abundância em células imunocompetentes, como os linfócitos B e T (Figura 1)¹⁴⁻¹⁷. Estas células são organizadas em tecidos linfóides associados à mucosa (MALT), que são os principais componentes do sistema imunitário da mucosa. A indução da resposta à mucosa leva à produção de SIgA^{3,4}. A produção de SIgA nas superfícies das mucosas é resultado da exposição local de antigénios aos tecidos linfóides associados à mucosa, especialmente aqueles do trato respiratório superior (tecido linfóide nasal ou NALT), do trato gastrointestinal (tecido linfóide associado ao intestino ou GALT)^{2,3,4,6} e do tecido linfóide associado aos brônquios (BALT)¹³. Anatomicamente, o GALT consiste nas placas de *Peyer*, agregados linfóides do apêndice vermiforme e intestino grosso, tecido linfático acumulado no trato gastrointestinal e pequenos agregados linfóides do esófago, enquanto o NALT contém as amígdalas palatinas e faríngeas^{15,18}. As superfícies epiteliais do NALT e do GALT contêm células M. Essas células podem transportar antigénios das superfícies mucosas para os tecidos linfóides subjacentes^{15,19}. Depois de entrar no MALT, os antigénios são rapidamente internalizados e processados pelas células apresentadoras de antigénios, como DCs subepiteliais e macrófagos, e posteriormente, apresentados às células B e T localizadas no MALT^{15,19}. Ao serem sensibilizadas pelos antigénios, as células B proliferam e sofrem

mudança de classe, comprometendo-se a produzir IgA. Essas células B eventualmente deixam o MALT e migram através da circulação sistêmica para vários locais da mucosa, incluindo o sítio de indução inicial onde se diferenciam em plasmócitos produtores de SIgA^{15,16}.

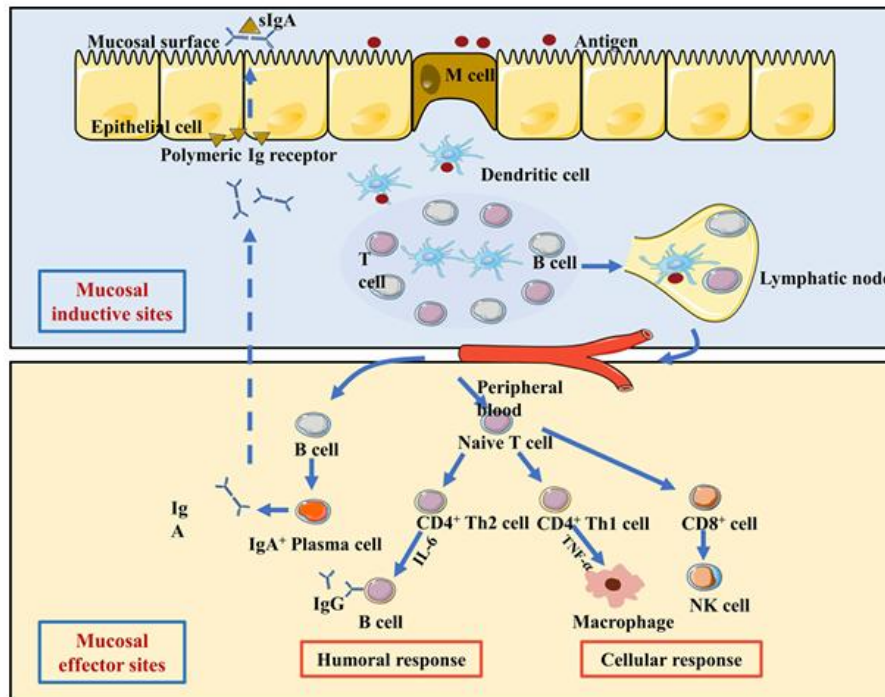


Figura 1: Resposta imune da mucosa específica do antígeno, Zhao *et al*¹⁷

4.1. Papel dos anticorpos secretores na defesa contra infecções

As mucosas secretoras e glândulas exócrinas dos adultos contêm mais de 80% de todas as células produtoras de anticorpos. Aproximadamente 80-90% dessas células são imunócitos (linfócitos imunocompetentes) IgA, e, geralmente, uma fração maior pertence à subclasse IgA2 quando comparado com os tecidos linfóides periféricos, alcançando predominância sobre a subclasse IgA1 na mucosa do intestino grosso²⁰.

Um aumento relativo de IgA2 nas secreções comparativamente com o soro pode ter grande impacto para a estabilidade dos anticorpos secretores porque a SIgA2, contrariamente à SIgA1, é resistente a várias proteases sintetizadas por algumas bactérias potencialmente patogênicas²¹. No entanto, a produção de IgA1 é mais significativa tanto na mucosa nasal (93%) quanto na brônquica (75%)²⁰ e os microrganismos como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* produzem proteases específicas para IgA1, que conseqüentemente, leva a que essas três espécies de microrganismos sejam propensas a produzir doenças invasivas do trato respiratório superior.

Mais de 90% dos imunócitos IgA na mucosa sintetizam a cadeia J, um peptídeo de 15 kDa, essencial para a correta polimerização da IgA polimérica (pIgA) e da IgM pentamérica^{20, 22}. Posteriormente, a cadeia J também permite a ligação ao recetor Ig polimérico (pIgR), uma glicoproteína expressa nas células epiteliais secretoras²⁰. O complexo ligante-recetor é endocitado, atravessa as células epiteliais e, após a clivagem apical do pIgR, é libertado na secreção (Figura 2)²³. A porção extracelular do recetor permanece ligada como componente secretor na SIgA e SIgM e estabiliza esses anticorpos. A ligação covalente entre o componente secretor e a cadeia α de pIgA torna a SIgA o anticorpo mais estável do sistema imunitário^{20, 22}. O pIgR clivado não ocupado é libertado em secreções como o componente secretor livre, que pode ajudar na defesa inata. A mucosa intestinal é o órgão efetor mais importante da imunidade humoral adaptativa, e a expressão do pIgR pode ser aumentada por citocinas como interferon- γ ^{20, 22}, interleucina (IL)-4, fator de necrose tumoral e IL-1. A expressão de pIgR depende da presença de vitamina A (ácido retinóico) e do estado nutricional adequado em humanos^{20, 25}.

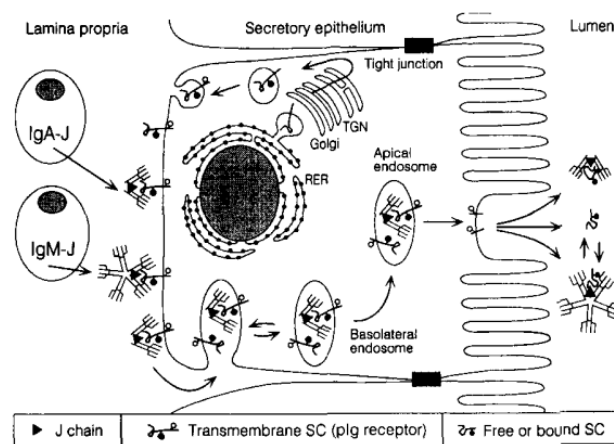


Figura 2: Produção local de IgA secretora e IgM secretora, adaptado, *Per Brandtzaeg et all*²³

Os esteroides podem aumentar a expressão do pIgR humano²⁰ sendo provável que este recetor esteja sob controlo hormonal da glândula lacrimal e do trato genital. A estimulação nervosa autónoma parassimpática e simpática das glândulas submandibulares de ratinhos foi descrita como tendo aumentando significativamente a produção de SIgA (em 2.6 e 6 vezes, respetivamente), o que pode demonstrar um efeito dos neurotransmissores nas células epiteliais secretoras²⁰.

O principal objetivo do sistema de anticorpos secretórios é, em cooperação com os mecanismos de defesa da mucosa inata, realizar a exclusão imune. É relevante salientar que a SIgA pode

inibir a colonização e invasão por microrganismos patogênicos²⁰. Ambos os anticorpos pIgA e IgM pentamérico internalizados pelo pIgR podem inclusive inativar vírus como por exemplo, rotavírus, vírus da gripe e vírus da imunodeficiência humana (HIV), dentro das células epiteliais e carregar os agentes patogênicos e os seus produtos de volta ao lúmen, evitando assim danos ao epitélio^{20, 26}. O efeito de aglutinação e neutralização viral através do pIgA é superior comparativamente aos anticorpos monoméricos²⁰, e os anticorpos SIgA podem bloquear a invasão microbiana com elevada eficiência²⁰. Assim, indivíduos negativos para o HIV que vivem junto com parceiros positivos para o HIV por vários anos, muitas vezes parecem estar protegidos por anticorpos SIgA específicos no trato genital^{20, 27}.

De acordo com as propriedades do componente secretor da membrana, a SIgA específica pode aumentar a adesão de bactérias e outros antígenos ao muco, promovendo, assim, a remoção pelo movimento ciliar respiratório e pelo peristaltismo intestinal. Existem funções de defesa de extrema importância como a capacidade dos anticorpos SIgA induzirem a perda de plasmídeos bacterianos que codificam moléculas associadas à adesão e resistência a antibióticos²⁰, a interferência com fatores de crescimento como o ferro e enzimas necessárias para a eliminação de bactérias patogênicas e parasitas²⁰, e uma influência positiva na fase indutiva da imunidade mucosal promovendo a captação de antígenos relevantes em GALT via um recetor de ligação de IgA em células. A última função evidencia a importância da amamentação fornecendo anticorpos SIgA relevantes da mãe para o intestino do lactente²⁰.

Estudos feitos com a indução de resposta por parte da SIgA na interferência da captação mucosal de macromoléculas em animais experimentais, mostram o aumento da permeabilidade mucosal e captação de antígenos de *Escherichia coli*^{20, 22}. Foi demonstrado na literatura, que anticorpos SIgA são essenciais na proteção contra a toxina da cólera (CT) sem expressão de cadeia J^{20, 28} ou pIgR^{20, 29}.

É difícil avaliar o efeito protetor dos anticorpos SIgA e SIgM durante infecções nas mucosas, devido à indução simultânea de imunidade humoral sistêmica. Isto pode ocorrer após imunização local com uma vacina viva e também, quando as partículas semelhantes a vírus ou vacinas de subunidades não proliferativas são aplicadas junto com um adjuvante mucosal apropriado. No trato respiratório, um efeito protetor de anticorpos séricos, principalmente IgG, pode contribuir para a exclusão imune, além da importância geral de inibir a disseminação adicional do agente infeccioso por neutralização dependente de anticorpos e eliminação imune dentro da lâmina própria²⁰. A produção de anticorpos ao nível das mucosas depende da forma

como o antígeno é apresentado, pelo que a via de administração é importante, pois influencia a eficácia, segurança e resposta imunológica gerada pela vacina.

5. Vias de administração e tipos de vacinas

5.1. Vias de administração

Ao longo dos anos e na atualidade, devido à sua eficácia, a maior parte das vacinas são administradas por via IM ou SC³⁰. Atualmente existem várias vias de administração de vacinas que serão descritas ao longo do texto.

A administração de vacinas por diferentes vias apresenta vantagens e desvantagens. As vacinas para administração IM são caras, exigem armazenamento em cadeia de frio e pessoal qualificado. Por outro lado, as vacinas orais são mais vantajosas para o paciente sendo fáceis de administrar embora, exijam as mesmas vias de conservação que as vacinas por via IM, bem como, a mesma qualificação de pessoal para a sua administração. As vacinas orais têm o potencial de estimular o MALT localizado no trato digestivo e o GALT, ambos relevantes para a indução de uma resposta ao nível da mucosa eficaz contra muitos vírus. Além disso, a vacina pode ser administrada por via oral de muitas formas distintas, como líquidos, cápsulas, comprimidos, comprimidos mastigáveis, etc³¹.

A administração oral é a preferida do ponto de vista do paciente, pois é a mais conveniente, económica e fácil de usar. Embora altamente desejável, a via oral tem algumas limitações importantes que precisam ser melhoradas de modo a obter uma formulação eficaz. As limitações incluem a baixa biodisponibilidade, a degradação da vacina por enzimas ou condições ácidas, a concentração inconsistente da vacina e o sabor. A biodisponibilidade é a principal preocupação para uma vacina administrada por via oral, o que leva à grande necessidade de identificar melhores opções para uma maior eficácia³¹.

Atualmente, existe um número limitado de vacinas orais licenciadas para uso humano em que utilizam microrganismos patogénicos vivos atenuados (Febre Tifoide; *Vivotif*[®], Cólera; *Orochol*[®], Rotavírus; *Rotarix*[®] e *RotaTeq*[®]) ou microrganismos patogénicos inteiros inativados (Cólera; *Dukoral*[®]). As vacinas orais disponíveis comercialmente têm mostrado alta eficácia em países industrializados, mas uma eficácia muito menor em países em vias de desenvolvimento. Embora a eficácia comprometida não seja muito bem compreendida, algumas possibilidades que justificam a menor eficácia incluem fatores nutricionais como a vitamina A, interação com os altos níveis de anticorpos no leite materno, enteropatia ambiental e infeção por *Helicobacter pylori*³².

As vacinas orais como as peptídicas, de DNA ou RNA é um desafio significativo para a tecnologia farmacêutica devido à sua baixa biodisponibilidade através do trato gastrointestinal. A explicação possível para a baixa absorção oral das vacinas pode incluir degradação enzimática, fraca penetração na membrana, metabolismo hepático e as características físico-químicas únicas da mucosa gastrointestinal. Como o trato gastrointestinal está continuamente exposto a uma ampla gama de agentes patogênicos, as vacinas orais bem-sucedidas precisam induzir sinais fortes e apropriados para serem reconhecidos pelo sistema imunitário. Caso contrário, o sistema imunitário do hospedeiro consideraria as vacinas como não imunogênicas, o que pode resultar numa resistência imunológica em vez de proporcionar proteção. Portanto, é importante selecionar adjuvantes eficazes e seguros para estimular suficientemente o sistema imunitário ao nível das mucosas. Uma vacina oral ideal deve proteger os antígenos da degradação através do trato gastrointestinal, proporcionar antígenos suficientes à superfície da mucosa indutiva, aumentar a captura de antígenos, ativar células imunológicas e produzir respostas imunológicas ao nível das mucosas que sejam eficazes e duradouras³².

A via SC é uma via muito utilizada para a administração de vacinas que se localiza na hipoderme e é composta por uma camada de gordura branca, também chamada de tecido adiposo, ligada à parte inferior da derme por extensas fibras de colagénio sendo composta principalmente por fibroblastos e adipócitos. A presença destes lípidos permite que as vacinas injetadas permaneçam neste local por um longo período, através de um mecanismo de depósito. O local anatómico determina a extensão da vascularização hipodérmica, o que permite o recrutamento de células imunes. Em contraste com a epiderme ou a derme, a hipoderme é naturalmente desprovida de células imunes residentes³³.

A vacinação epidérmica refere-se a um método de vacinação que visa a epiderme após passar pela camada córnea com uma micro ou nano agulha. O termo vacinação transcutânea ou transdérmica destina-se à aplicação tópica de antígenos na epiderme. As técnicas de vacinação transcutânea são diversas e minimamente invasivas. São realizadas na pele que está intacta (incluindo a camada córnea) ou que foi pré tratada (disrupção química ou física da camada córnea, parte acelular da epiderme)³³.

A administração pela via IM é uma outra via usada para a administração de vacinas. Este método visa o depósito da vacina diretamente no tecido muscular profundo. O músculo estriado caracteriza-se pela sua elevada vascularização, o que representa uma maior velocidade de absorção quando comparado com a via SC, resultando numa ação sistémica mais rápida⁵.

A via IM é a preferencial para a administração de substâncias irritantes e viscosas, uma vez que o músculo é pouco enervado por fibras sensoriais o que resulta numa sensibilidade reduzida. Podem ser administrados, por esta via, medicamentos que se apresentem em solução ou suspensão aquosa, ou que contenha um veículo não aquoso (p. ex., oleosos ou glicóis). A via IM permite a absorção de maiores volumes, sendo que o volume máximo de medicamento a administrar depende da dimensão do músculo selecionado e da respetiva capacidade de difusão e absorção. Estima-se que os músculos de maior dimensão tenham uma capacidade para volumes compreendidos entre 2 e 5 ml, e volumes entre 1 e 2 ml para músculos mais pequenos. A administração de um volume superior ao recomendado, além de comprometer a adequada difusão do fármaco, pode comprimir a estrutura neurovascular local, o que pode levar a mal-estar ou dor, aumento da temperatura local, hiperemia, ou até mesmo uma lesão local mais grave, podendo causar alteração da sensibilidade e/ou mobilidade do membro e necrose. Por serem dotados de uma grande área vascular, o que permite uma rápida absorção, e por apresentarem, em relação a outros músculos, menor risco de lesão de estruturas anatómicas subjacentes, nomeadamente vasos de grande calibre, ossos e estruturas nervosas, os músculos identificados como os mais adequados e seguros para administração de medicamentos são o músculo deltoide, glúteo máximo, glúteo médio e mínimo e ântero-lateral da coxa (vasto lateral)⁵.

Existem outras vias de administração de vacinas menos comuns como a via sublingual, nasal, vaginal e retal.

A via sublingual tem sido utilizada durante muitos anos para a administração de medicamentos e de pequenas moléculas ao fluxo sanguíneo. O potencial desta via de administração de vacinas foi desvalorizado durante muito tempo. Nos últimos anos, vários laboratórios documentaram a eficácia da imunização sublingual em induzir uma ampla gama de respostas imunológicas em diferentes sistemas experimentais animais, utilizando uma variedade de antigénios, incluindo proteínas solúveis, antigénios particulados inertes (vírus mortos, partículas semelhantes a vírus, extratos bacterianos) e vírus vivos atenuados. Na maioria dos casos, as respostas imunes sistémicas e mucosas, incluindo respostas humorais e de células T citotóxicas, foram induzidas tanto em tecidos mucosos quanto extra-mucosos. No geral, a imunização sublingual foi comparável à imunização nasal em termos de magnitude, amplitude e disseminação anatómica das respostas imunológicas induzidas^{34, 35}.

A mucosa nasal desempenha um papel fundamental no sistema imunitário mucosal, sendo, por norma, o primeiro ponto de contato para antigénios inalados. A imunização intranasal tem-se

destacado como uma via eficaz para a administração de vacinas que visam tanto a imunidade periférica quanto a mucosal. Vários fatores tornam a via nasal atraente para a imunização, incluindo sua acessibilidade, intensa vascularização, presença de microvilosidades que aumentam a superfície de absorção e a capacidade de induzir respostas imunológicas tanto na mucosa quanto sistêmicas. Esta via de administração apresenta como vantagens a fácil acessibilidade, sendo uma técnica simples e prática. A alta vascularização também é muito importante, uma vez, que a mucosa nasal possui uma rica rede de vasos sanguíneos promovendo uma rápida absorção. No que diz respeito à grande superfície de absorção, as microvilosidades aumentam significativamente a área de contacto. Quanto à indução de respostas imunológicas, estas são capazes de induzir respostas tanto locais quanto sistêmicas. A imunização em grandes grupos é possível pela facilidade de administração e não necessita de agulhas, eliminando assim, o risco de infecções^{36, 37}.

Ao considerar aspectos da imunização nasal, é importante lembrar que alguns artigos descrevem a administração “nasal” envolvendo outras superfícies mucosas. Grandes doses administradas pelo nariz podem ser engolidas, levando à via oral. A quantidade de material utilizada na vacinação nasal é crucial. Por exemplo, volumes maiores podem resultar em uma porção significativa da dose entrando nos pulmões, enquanto volumes menores tendem a ser retidos nas passagens nasais^{36,37}.

A administração de substâncias medicamentosas por via vaginal é uma prática médica utilizada, especialmente eficaz no tratamento de condições genitais locais, como infecções, lesões neoplásicas e vaginite atrófica, além de ser utilizada para fins contraceptivos e de indução/prevenção do trabalho de parto. A via vaginal oferece vantagens significativas, como facilidade de administração e redução da exposição sistêmica ao medicamento, evitando o efeito de primeira passagem hepática. As formas farmacêuticas semissólidas, como os géis, são preferíveis, mas os comprimidos, supositórios, espumas e soluções, também são comuns. Recentemente, formulações baseadas em filmes e anéis têm atraído especial atenção devido à sua capacidade de fornecer liberação prolongada. No entanto, essas formas de dosagem apresentam algumas limitações, por ser difícil de controlar o destino das substâncias ativas após a sua liberação no muco vaginal, o que pode ser problemático para medicamentos com problemas de estabilidade ou permeabilidade³⁸.

Uma outra via de administração é a via retal. Esta via pode ser apropriada para a imunização contra agentes entéricos como os rotavírus. Estudos com vacinas intrarretais usando estirpes atenuadas ou antigénios de poliovírus, peptídeos do HIV ou mesmo vírus da gripe induziram

respostas específicas localizadas no intestino e em outros locais que compartilham uma imunidade mucosal comum^{39, 40}.

Para além da via de administração, o tipo de antigénio utilizado numa vacina pode ter impacto na estimulação ao nível das mucosas, ou seja, é crucial para garantir uma melhor resposta imunológica eficaz, segura e prática. Para cada tipo de vacina existe uma via específica de administração, tendo em conta o seu modo de interação com o sistema imunitário e o tipo de resposta que visa gerar.

5.2. Tipos de vacinas

Existem maioritariamente sete tipos de vacinas que podem ser classificadas como, vivas atenuadas, inativadas, de subunidades, toxoides e conjugadas, vacinas de DNA e RNA e vetorial recombinante^{31, 41}.

As vacinas vivas usam uma forma atenuada dos agentes patogénicos que causam uma doença. Como essas vacinas são semelhantes à infeção natural, elas podem produzir uma forte resposta imunológica e podem ter efeito de longa duração. Apenas 1 ou 2 doses da maioria das vacinas vivas são suficientes para produzir o efeito imunológico desejado. No entanto, as vacinas vivas têm algumas limitações em termos de produção, manipulação e efeitos adversos. É necessária uma segurança estendida para lidar com a produção da vacina quando vírus vivos são usados como antigénio. Deve haver um cuidado especial em certas populações como pessoas com sistemas imunitários enfraquecidos, problemas de saúde de longo prazo ou pessoas que passaram por transplantes. Outra limitação é o facto das vacinas vivas precisarem de ser bem preservadas em sistemas de armazenamento a frio, o que limita seu uso em massa em países em desenvolvimento onde a vacinação em massa é mais necessária. As vacinas vivas protegem contra doenças como sarampo, rubéola, rotavírus, varíola, varicela, febre amarela e *herpes zoster*. As dosagens na forma líquida são administradas por via SC ou oral³¹.

As vacinas inativas usam a versão morta do agente patogénico que causa a doença. As vacinas inativas geralmente não fornecem imunidade tão forte quanto as vacinas vivas, sendo necessárias múltiplas doses em que várias doses de reforço são seguidas pela dose inicial. As vacinas inativas são mais estáveis e seguras do que as vacinas vivas. Outra vantagem das vacinas inativadas é que não requerem conservação a baixas temperaturas, portanto, podem ser facilmente armazenadas e transportadas em forma liofilizada, o que proporciona a sua aplicação em países com dificuldades nas cadeias de frio. Estas vacinas protegem contra a hepatite A,

gripe, poliomielite e raiva e são administradas em forma de suspensão. As vias de administração mais comuns são a IM, SC e a intradérmica³¹.

As vacinas de subunidade usam apenas uma parte dos agentes patogênicos para estimular o sistema imunitário. Em alguns casos, essas vacinas usam epítopos - as partes muito específicas do antígeno que os anticorpos ou células T reconhecem e se ligam. Como as vacinas de subunidade contêm apenas a parte essencial dos antígenos e não os microrganismos inteiros, as possibilidades de reações adversas à vacina são menores. Um exemplo é a vacina contra o vírus da hepatite B, estando os estudos em constante progresso para a produção de uma vacina de subunidade recombinante contra o vírus da hepatite C. As vacinas de subunidade são administradas em forma de solução por via IM ou SC³¹.

As vacinas conjugadas são idênticas às vacinas de subunidade em que apenas usam uma pequena parte de uma bactéria ligada a uma proteína transportadora. Algumas bactérias possuem um revestimento externo de polissacarídeos que disfarçam os antígenos de uma bactéria para que os sistemas imunitários imaturos de bebês e crianças mais jovens não possam reconhecê-los ou responder a eles. As vacinas conjugadas, que são um tipo especial de vacina de subunidade, contornam esse problema. Estas vacinas são usadas para criar uma resposta imune combinada mais poderosa, em que, a parte da bactéria usada sozinha não produz uma resposta imune forte por si só, e quando combinada com a proteína transportadora pode gerar imunidade contra futuras infecções. As vacinas conjugadas são usadas na proteção contra o *Haemophilus influenzae* tipo B³¹.

As vacinas com toxoides são produzidas a partir da toxina produzida pelas bactérias que sofre um processo de destoxificação. A resposta imune é direcionada para a toxina em vez do microrganismo patogênico inteiro. As vacinas toxoides são usadas para proteger contra difteria e tétano. Estas são administradas em forma de suspensão por via IM³¹.

As vacinas de DNA baseiam-se em antígenos virais codificados por um plasmídeo recombinante. As proteínas ou polipeptídeos virais são produzidos pelos processos de transcrição e tradução nas células hospedeiras. No caso do desenvolvimento da vacina para a COVID-19 a sequência foi a seguinte: Aquisição da sequência da proteína *Spike* a partir do GISAID (Iniciativa Global de Compartilhamento de Dados da *Influenza* Aviária); adição da sequência principal IgE N-terminal; Otimização da sequência IgE-*Spike* de modo a melhorar a expressão e imunogenicidade e por fim a ligação do fragmento ao vetor da expressão pGX0001 após digestão⁴¹.

As vacinas de mRNA contra a COVID-19 são baseadas em mRNA encapsulado por vetores, geralmente nanopartículas lipídicas (LNPs), que facilitam a produção de proteínas virais ou polipeptídeos durante o processo de tradução nas células hospedeiras⁴¹.

As vacinas de vetor viral baseiam-se em vírus geneticamente modificados com replicação atenuada que transportam o material genético que codifica as proteínas ou polipeptídeos virais. O antígeno específico é produzido pelas células hospedeiras após a transdução imunológica⁴¹. Mediante o tipo de vacinas, estas precisam de um adjuvante específico de modo a maximizar a eficácia da resposta imunitária, especialmente daquelas que precisam induzir imunidade nas mucosas. Os adjuvantes têm como objetivo melhorar a resposta imune especialmente quando o antígeno por si só não é suficiente para gerar uma resposta robusta.

6. Adjuvantes da mucosa

Os adjuvantes são definidos como vários componentes que aumentam a imunogenicidade das vacinas quando administrados em conjunto com os antígenos vacinais. Os adjuvantes podem variar desde compostos sintéticos de pequenas moléculas até extratos naturais complexos e materiais particulados^{42,43,44}. A primeira descoberta de adjuvantes foi em 1926, quando *Alexander Glenny* descobriu que a mistura de sais de alumínio com antígenos e a sua administração em cobaias induziu mais anticorpos do que a administração de antígenos sozinhos (Figura 3)^{42, 45}. Posteriormente, na década de 1940, *Freund* e os seus colegas desenvolveram emulsões óleo-em-água, que levaram à criação dos adjuvantes de *Freund*. No entanto, o adjuvante de *Freund* não foi licenciado para uso em vacinas humanas devido à sua toxicidade para humanos. Similar a estes adjuvantes há o uso do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) em vacinas humanas que tem sido limitado devido aos seus efeitos adversos locais e sistémicos. Desde 1920 até 1990, apenas os adjuvantes de alumínio foram aprovados, apesar dos esforços para desenvolver novos adjuvantes para vacinas humanas. Foi em 1997 que a emulsão óleo-em-água MF59 foi aprovada na Europa como adjuvante para vacinas contra *influenza*. Nos 20 anos seguintes, outros quatro adjuvantes (AS04, AS03, AS01 e CpG ODN 1018) foram licenciados para uso em vacinas, o que mudou a monotonia dos adjuvantes para vacinas humanas. Muitas outras classes de diferentes compostos foram avaliadas como adjuvantes durante esse período, incluindo sais minerais, produtos microbianos, emulsões, saponinas, agonistas sintéticos de pequenas moléculas, polímeros, NPs e lipossomas que mostraram aumentar a força, amplitude e persistência das respostas imunes em estudos pré-clínicos e clínicos^{42, 46}.

Embora os adjuvantes sejam extremamente utilizados em vacinas há muito tempo, os mecanismos pelos quais eles aumentam as respostas imunes não foram bem explicados. Foi somente com a revelação do mecanismo pelo qual a resposta imune inata controla a resposta imune adaptativa que se começou a perceber os mecanismos de ação dos adjuvantes. Os adjuvantes direcionam e aumentam respostas imunes adaptativas específicas, visando células imunes inatas e ativando as vias de sinalização dos recetores de reconhecimento de padrões (PRRs). Subsequentemente, descobriu-se que alguns materiais de veiculação também podem atuar como adjuvantes, aumentando respostas imunes adaptativas por meio da imitação do tamanho ou estrutura espacial de agentes patogénicos naturais para facilitar a captura e apresentação de antígenos por células apresentadoras de antígenos (APCs)^{42, 47}.

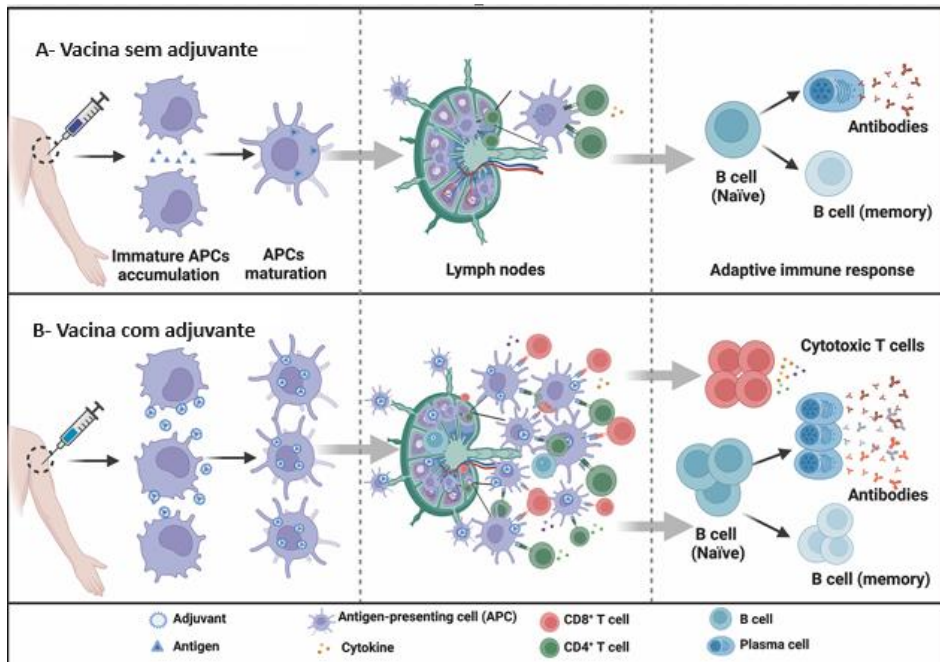


Figura 3 – Vacinas com e sem adjuvante, adaptado Zhao et al⁴²

6.1. Modos de ação em adjuvantes de vacinas ao nível das mucosas

Muitas substâncias como partículas, produtos químicos e óleos, têm sido estudadas como adjuvantes de vacinas em experiências com animais e ensaios clínicos. Os adjuvantes promovem a geração de sinais de apresentação do antígeno (sinal 1) e sinais de coestimulação (sinal 2) ativando APCs. Os sinais de apresentação de antígeno são os complexos peptídeo-major de histocompatibilidade (MHC) que são apresentados na superfície das APCs após a captura e processamento dos antígenos. Os sinais de coestimulação incluem moléculas coestimulatórias (por exemplo CD40, CD80, CD86) expressas na superfície das APCs e citocinas inflamatórias secretadas (por exemplo IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α)^{42, 48}.

Existem duas classes principais: agonistas de receptores imunes inatos e outros (Figura 4)⁴⁹. Os agonistas de receptores imunes inatos funcionam como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Eles são reconhecidos diretamente por receptores imunes inatos, como receptores do tipo Toll (TLRs), receptores do tipo RIG-I (RLRs), receptores do tipo Nod (NLRs), receptores de lectina do tipo C, receptores do tipo AIM2 (ALRs) e cGAS/STING, e induzem respostas de citocinas pró-inflamatórias e interferon, coletivamente referidas como “respostas imunes inatas”^{49, 50, 51}. Os modos de ação na categoria "outros" podem ser subdivididos em indutores de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e sistemas de veiculação de antígenos puros. Adjuvantes que são categorizados como indutores de DAMP não causam nenhuma resposta imune inata *in vitro*, como secreção de citocinas ou maturação de DCs, eles

apenas induzem respostas imunes inatas *in vivo*. Essas substâncias injetadas agem destruindo as células do hospedeiro, fazem com que haja a libertação de vários fatores classificados como DAMPs (por exemplo, DNA e RNA), que posteriormente ativam recetores imunes inatos. Os adjuvantes indutores de DAMP geralmente são substâncias não derivadas de agentes patogénicos, como lípidos, sais minerais ou partículas poliméricas^{49, 50, 51}. Os adjuvantes de sistemas de veiculação pura são totalmente inertes tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em termos de indução de resposta imune inata. A transferência do antígeno às células apresentadoras de antígenos, como as DCs é muito eficaz e a subsequente apresentação de antígenos mediada por DCs resulta numa resposta imune adaptativa aprimorada⁴⁹.

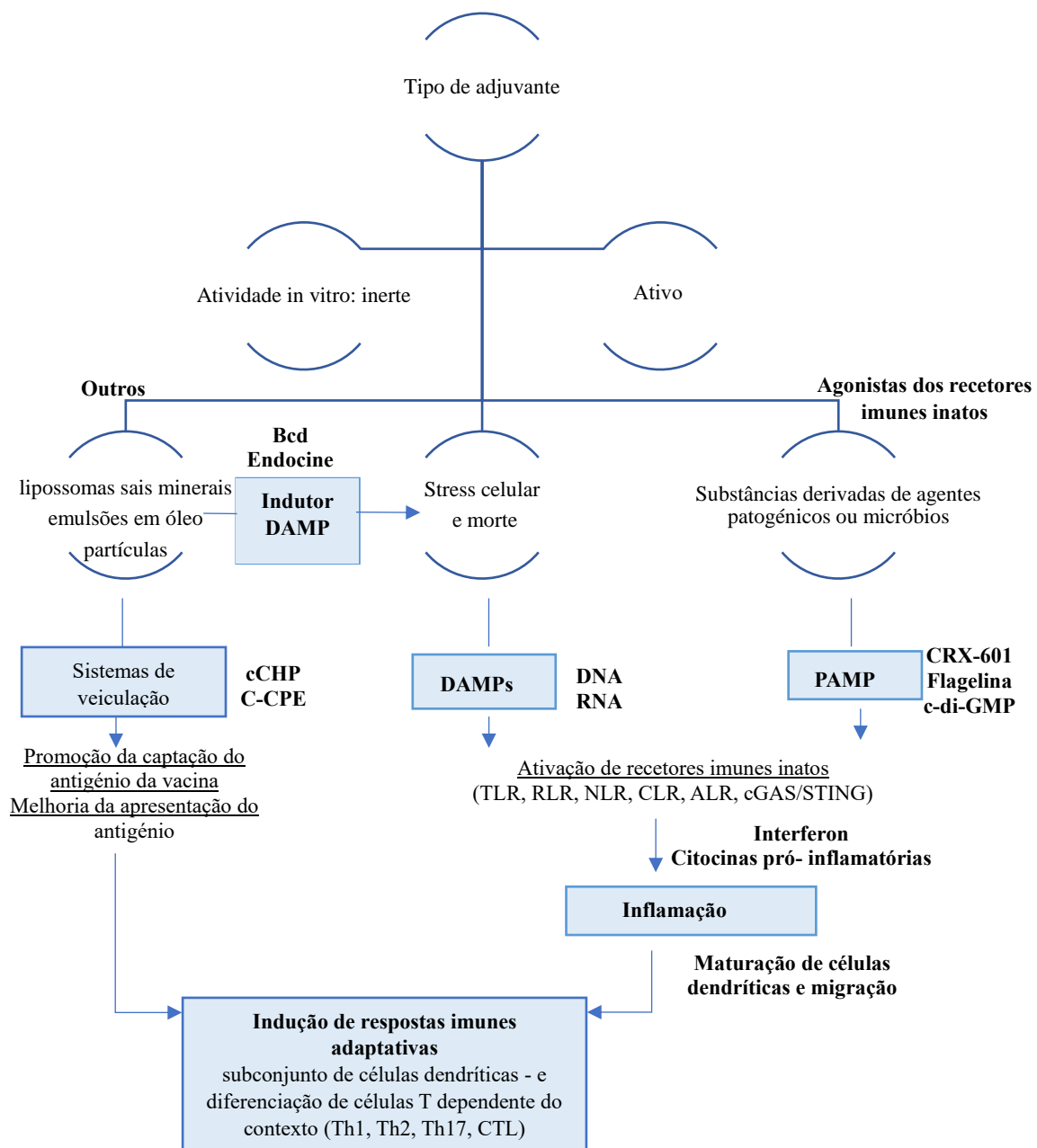


Figura 4: Classificação de adjuvantes baseada no modo de ação, adaptado, *Taiki Aoshi*⁴⁹.

As superfícies mucosas, atuam como barreiras físicas impedindo que os antígenos da vacina e os adjuvantes alcancem as células epiteliais das mucosas e outras células potenciais transportadoras de antígenos, como células caliciformes, macrófagos CX3CR1⁺, formadores de dendritos transepiteliais (TED)^{49, 52}, células M e DCs intraepiteliais na mucosa. As células que compõem o epitélio mucoso estão interconectadas por junções apertadas e formam uma barreira impermeável a substâncias estranhas. Pequenos produtos químicos, como o adjuvante c-di-GMP, podem ser difundidos passivamente e conseguem atravessar essa barreira através do espaço intercelular entre as células epiteliais; esse mecanismo é chamado de via paracelular. Antígenos direcionados às células epiteliais, como os antígenos direcionados a FcRn^{49, 53} ou claudina 4 (pequenas proteínas transmembranares)^{49, 54, 55} são transportados pela transcitose (combinação de endocitose e exocitose) mediada por receptor das células epiteliais na via transepitelial. Antígenos solúveis experimentais, como ovoalbumina ou dextrano, podem ser capturados pelas células caliciformes na via das mesmas ou pelos macrófagos CX3CR1⁺ formadores de dendritos transepiteliais na via TED. NPs e algumas bactérias são capturadas pelas células M na via das células M ou pelas DCs intraepiteliais na via das DCs intraepiteliais. O dano às células epiteliais também rompe fisicamente a barreira mucosa, permitindo que os antígenos sejam transportados para a lâmina própria através da via de dano às células epiteliais. Para todas as vias, os antígenos translocados são captados por DCs teciduais mucosas e posteriormente algumas dessas DCs transportadoras de antígenos migram para os linfonodos drenantes⁴⁹.

6.2. Avanços recentes no desenvolvimento de vacinas e sistemas de veiculação

Avanços mais recentes deram origem a vários estudos como por exemplo, vetores recombinantes vivos virais ou bacterianos, onde são geneticamente modificados de modo a expressar antígenos estranhos ou desconhecidos. Estes microrganismos são atenuados por meio de mutação de modo a reduzir a sua virulência. Apesar da virulência reduzida, podem ser capazes de colonizar e invadir as superfícies mucosas. Portanto, uma única inoculação destes vetores na mucosa numa dose moderada pode replicar-se para uma dose imunogénica muito grande *in vivo* levando, conseqüentemente, a respostas imunológicas fortes e duradouras¹⁵.

As vacinas comestíveis tornaram-se numa estratégia criativa para a distribuição de antígenos nas mucosas e tornou-se possível através da incorporação de genes que codificam antígenos em espécies de plantas. O conceito de utilização de plantas para produção e distribuição de

antigénios na mucosa foi estudado pela primeira vez por *Arntzn et al.* em 1992, em plantas de tabaco que foram geneticamente modificadas com o gene que codifica antigénio de superfície da hepatite B^{15, 56}. O antigénio produzido nas plantas transgénicas de tabaco mostrou-se semelhante aos utilizados nas vacinas comerciais derivadas da levedura recombinante. Desde então, os antigénios como a glicoproteína do vírus da raiva^{15, 55}, a proteína do envelope viral *Norwalk*^{15, 57}, VP60 do vírus da doença hemorrágica de coelho^{15, 58} e a subunidade B da enterotoxina termolábil da *E. coli* (LT-B) e *V. cholerae* (CT-B) foram todos produzidos em plantas transgénicas, como tomate e batata. A imunogenicidade destes antigénios derivados de plantas foi demonstrada através da alimentação de animais com plantas transgénicas e induzindo efeitos sistémicos e mucosos^{15, 59}.

A injeção IM de DNA plasmídico que codifica um antigénio, pode induzir respostas imunes mediadas por anticorpos e células e tem sido extensivamente explorada na produção de vacinas ao nível das mucosas. As vacinas de DNA plasmídico aquando da administração intracelular podem induzir uma expressão transitória do antigénio codificado dentro da célula hospedeira. Isto permite o acesso do antigénio codificado à via celular de apresentação do antigénio do MHC de classe I, que é responsável pela indução da imunidade mediada por células. Portanto, além das respostas de anticorpos que são induzidas pela via de apresentação do antigénio do MHC de classe II, as vacinas de DNA são capazes de induzir respostas imunes celulares, que são especialmente eficazes contra agentes patogénicos bacterianos, virais e intracelulares^{15, 60}.

Os RNAs de cadeia dupla sintéticos (dsRNAs) podem direcionar e ativar o TLR3 e MDA5 em APCs, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e interferons do tipo I, levando à produção de fortes respostas imunológicas enviesadas para Th1 e células T citotóxicas (CTLs). Poly-I e a sua variante modificada Poly-ICLC são os imunostimulantes dsRNA sintéticos mais estudados. Em estudos *in vitro*, Poly-I e Poly-ICLC induzem a maturação de DCs derivadas de monócitos do sangue periférico humano, levando à secreção de IFN- β e citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-12, resultando na apresentação cruzada de antigénios exógenos com células T CD8+ que desencadeiam uma resposta imune polarizada para Th1. Os estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que Poly-I e Poly-ICLC são adjuvantes promissores que aumentam a produção de anticorpos e respostas imunes de células T CD8+⁶¹⁻⁶⁴.

Um outro avanço consistiu no desenvolvimento de partículas poliméricas biodegradáveis, como as micro e NPs produzidas a partir de materiais biodegradáveis, onde demonstram que polímeros flexíveis encapsulam eficazmente alguns antigénios da vacina protegendo-os da

degradação da mucosa. A principal vantagem destes polímeros é a sua biodegradabilidade¹⁵. A liberação de antígenos encapsulados é controlada pela degradação dos polímeros. A taxa de degradação do polímero pode ser adaptada para libertar antígenos durante um período prolongado e, assim, reduzir a frequência de vacinação necessária para estabelecer uma imunidade a longo prazo. O polímero poli (D, L-lactídeo-co-glicólido) (PLG)^{15, 65} é estudado mais extensivamente devido aos seus efeitos a nível humano. O polímero PLG é biodegradável através de hidrólise originando metabólitos endógenos e ácidos láctico e glicólico. A taxa de liberação de um antígeno encapsulado a partir de partículas de PLG é controlada pela taxa de degradação das partículas, que por sua vez é determinada pela composição do polímero e o seu peso molecular. Um outro tipo de polímeros também utilizados são os polímeros biodegradáveis solúveis em água que são potenciais veículos de distribuição de vacinas. A maior vantagem dos polímeros solúveis em água é a eliminação de solventes orgânicos do processo de encapsulamento do antígeno. Os solventes orgânicos podem afetar negativamente a estabilidade do antígeno durante o encapsulamento. Um desses polímeros biodegradáveis solúveis em água, biocompatível e biodegradável de baixa toxicidade, o quitosano (polissacarídeo composto por glucosamina em Co polímero de *N*-acetilglucosamina), ganhou muita atenção nos últimos anos. É derivado de quitina presente em conchas de crustáceos por desacetilação parcial e possui propriedades mucoadesivas sendo um intensificador de absorção da mucosa^{15, 65}. O quitosano possui algumas propriedades relevantes para a vacinação mucosal, como molécula carregada positivamente que interage com o muco carregado negativamente para melhorar a adesão. Esta molécula melhora a permeabilidade devido à sua capacidade de abrir temporariamente as junções estreitas epiteliais, e, assim, melhora a amostragem do antígeno e as suas propriedades adjuvantes que promovem a secreção de INF- γ , IgG e SIgA³. As partículas lipídicas também foram exploradas como transportadoras protetoras para vacinas das mucosas. A forma mais comum de partículas lipídicas são os lipossomas que têm sido utilizados para administração de vacinas com algum sucesso. Foi demonstrado que a coadministração de antígenos e adjuvantes em lipossomas pode melhorar significativamente as respostas imunológicas. Por exemplo, a IL -12 melhorou as respostas de anticorpos séricos quando foi coadministrada por via intranasal com lipossomas contendo glicoproteínas recombinantes de *herpes vírus bovino tipo 1*. Outros adjuvantes, como o monofosforil lipídeo A, a subunidade B da CT e o fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos, também demonstraram melhorar as respostas imunes induzidas por antígenos lipossomais^{15, 66, 67, 68}.

A estabilidade dos lipossomas tem limitado a sua utilidade como transportadores de vacinas, principalmente na administração oral, onde os próprios lipossomas são suscetíveis à dissolução no intestino e à degradação através das fosfolipases intestinais. As técnicas utilizadas para estabilizar lipossomas incluem formulações lipídicas variadas nos lipossomas^{3, 36} e polimerização de membranas lipossomais^{15, 69}.

Os ISCOMs (complexo imunoestimulante) são partículas carregadas negativamente com 30-40 nm de diâmetro, usada como sistema de veiculação para antígenos, são constituídos pela mistura de lípidos, colesterol e Quil A (mistura de Saponinas *Quillaja* extraídas da casca da árvore *Quillaja sapanaria Molina*) que é um potente imunoadjuvante. Antígenos hidrofóbicos podem ser incorporados aos ISCOMs espontaneamente. Esta incorporação, pode exigir a modificação dos antígenos antes de serem inseridos nos ISCOMs^{15, 70}.

Os ISCOMs contêm o uso de proteínas do envelope do vírus sincicial respiratório (RSV), onde induziram respostas séricas de IgG após administrações intranasais a camundongos. Também induziram respostas significativas ao nível de sIgA expressas localmente nos pulmões e no trato respiratório superior, e remotamente nos genitais e tratos intestinais. A imunização intranasal da nucleoproteína do vírus *influenza A* em ISCOMs induziu fortes respostas de anticorpos e imunidade mediada por células. A principal vantagem dos ISCOMs decorre do fato de que a estrutura do ISCOM combina a adjuvanticidade da saponina *Quillaja* e a imunogenicidade do antígeno incorporado na mesma entidade^{15, 71}.

As imidazoquinolinas podem ativar TLR 7/8, levando à ativação de NF-κB e IRF7, promovendo a produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons do tipo I, resultando na produção de células T do tipo Th1 e CTLs. Imiquimod (R837), resiquimod (R848) e 3M-052 (também conhecido como telratolimod) são as imidazoquinolinas mais estudadas como adjuvantes em configurações pré-clínicas e clínicas. Evidências substanciais sugerem que o R837 exibe forte ação adjuvante em vacinas contra melanoma, HPV, cancro de mama e linfoma de células T. Vacinas virais e tumorais associadas ao R848 mostraram induzir respostas humorais mais fortes e respostas imunes de células T CD8+. O 3M-052 é um composto de imidazoquinolina com estrutura semelhante à de R848, cuja cadeia de acil C18 confere maior hidrofobicidade, resultando na melhoria da biodisponibilidade no local imune e havendo a redução da probabilidade de transmissão sistêmica. Além disso, essa lipidificação facilita a incorporação de 3M-052 em formulações baseadas em lípidos, como emulsões ou lipossomas. Vacinas de HIV formuladas com 3M-052 encapsulado em NPs de Poli(ácido lático-co-

glicólico) (PLGA) ou alumínio mostraram induzir altos e sustentados níveis de respostas de anticorpos e células T^{72,73}.

O glucopiranosil lipídeo A (GLA) é um mimético sintético de LPS que é uma alternativa ao MPLA. GLA pode induzir respostas imunológicas do tipo Th1 *in vivo* ao ativar TLR4 nas APCs. GLA é comumente preparado como suspensão aquosa de glucopiranosil lipídeo A (GLA-AF), emulsão estável de glucopiranosil lipídeo A (GLA-SE), lipossoma de glucopiranosil lipídeo A (GLA-LS) e glucopiranosil lipídeo A com hidróxido de alumínio (GLA-alum). Entre elas, GLA-SE é a mais documentada em estudos pré-clínicos e clínicos. Quando usado como adjuvante para a vacina de subunidade H5N1, o GLA-SE induziu a produção de células T CD4⁺ do tipo T1 específicas ao antigénio e maiores títulos de anticorpos do tipo Th1, protegendo camundongos e furões do desafio do vírus H5N1. Em primatas não humanos, GLA-SE induz mais citocinas do tipo Th1 quando usado como adjuvante de vacina contra *influenza* e induz a produção de anticorpos neutralizantes contra múltiplas variantes do vírus *influenza*, melhorando significativamente o efeito imunoprotetor da vacina. Em vários ensaios clínicos, quando usado como adjuvante para a vacina contra a tuberculose e testado contra a proteína recombinante ID93, a vacina induziu alta produção de anticorpos específicos ao antigénio e respostas de células T CD4⁺, demonstrando boa segurança e imunogenicidade nas populações vacinadas. Além disso, o GLA-SE foi clinicamente avaliado como adjuvante de vacinas contra malária, tumores, HIV, leishmaniose visceral e esquistossomose. Esses ensaios clínicos sugerem que o GLA-SE é um adjuvante de vacina eficaz e seguro com potencial como adjuvante de próxima geração^{72, 74}.

Os CpG ODNs são moléculas de DNA de cadeia simples sintéticas, amplamente estudadas como agonistas de TLR9. Entre eles, os mais comumente usados como adjuvantes de vacinas são CpG ODN 1018, CpG ODN 7909 e IC31. Eles podem levar à ativação transcricional de TRF7, que, por sua vez, leva à produção de citocina IL-12 e interferons do tipo I, induzindo uma forte resposta de células Th1 e produção de CTLs. CpG ODN 1018 é o mais estudado em ensaios pré-clínicos e clínicos. Além do CpG ODN 1018, CpG ODN 7909 é o segundo mais estudado. O CpG ODN 7909 mostrou melhoria na taxa de resposta de pacientes HIV positivos à vacinação, demonstrando o potencial promissor das vacinas formuladas com CpG ODN 7909 para melhorar as taxas de resposta vacinal em indivíduos imunocomprometidos^{72, 75}.

O STING é um recetor citosólico crucial para a deteção de DNA exógeno e sinalização imune inata. O STING agonista adjuvante mais proeminente em estudos pré-clínicos e clínicos é o cGAMP (3'3'-cGAMP). Vacinas com cGAMP podem induzir forte resposta humoral e

imunidade de células T contra influenza, HIV e cancro. Ensaios clínicos recentes mostram que cGAMP pode ser uma estratégia adjuvante promissora para a produção de vacinas⁷².

A CT e a enterotoxina termolábil (LT), produzidas por *V. cholerae* e *E. coli*, respetivamente, são toxinas bacterianas comprovadamente eficazes como adjuvantes mucosos. Ambas têm subunidades A e B, sendo a subunidade A responsável pela atividade adjuvante. Elas aumentam os níveis de cAMP nas células epiteliais, levando à ativação da proteína quinase A (PKA) e à secreção de fluídos. O componente B liga-se a recetores nas células hospedeiras para facilitar a entrada da toxina. Apesar da sua toxicidade, são usadas como adjuvantes mucosos devido à sua capacidade de induzir respostas imunes. Esforços são feitos para desenvolver versões não tóxicas dessas toxinas para uso seguro em vacinas¹⁵.

Vários adjuvantes têm mostrado ser eficientes como adjuvantes mucosos, incluindo a IL-12, dipeptídeo muramílico (MDP), avridina, monofosforil lipídeo A (MPL), sais de alumínio e MF59^{15, 76}. Estes adjuvantes foram estudados em modelos animais, demonstrando melhorias nas respostas imunes ao nível das mucosas quando administrados junto com antigénios por via intranasal. Por exemplo, a IL-12 aumentou os níveis de anticorpos e melhorou a sobrevivência após desafio viral em camundongos. O MDP e os seus derivados também mostraram aumentar a resistência do hospedeiro contra infeções virais ao nível das mucosas. A avridina, quando incorporada em lipossomas, induziu produção de sIgA no trato respiratório e aumentou as respostas imunes mucosas. MPL e sais de alumínio também melhoraram as respostas imunes quando administrados nas mucosas. O MF59, uma emulsão de óleo em água, mostrou adjuvanticidade mucosa em modelos animais^{15, 77}. Na tabela 1 encontram-se resumidos todos os sistemas de veiculação mencionados bem como as suas vantagens.

Tabela 1 – Sistemas de veiculação

Sistema de veiculação	Descrição	Vantagens /Utilização
Polímero PLG (Poli(D, L-lactídeo-co-glicólido))	Biodegradável através de hidrólise, gera ácidos láctico e glicólico.	Libertação controlada dos antígenos.
Vacinas de DNA Plasmídico	DNA plasmídico que codifica antígenos.	Induzem respostas eficazes contra agentes patogénicos virais e intracelulares.
dsRNA	Ativa TLR3 e MDA5, promovendo respostas Th1.	Induzem respostas imunes fortes com células T citotóxicas, importante em vacinas contra vírus e alguns tipos de cancro.
Imidazoquinolinas	Ativam TLR7/8 e geram respostas Th1 e CTLs.	Aumentam a produção de anticorpos e células T citotóxicas, eficazes contra cancro e doenças virais.
GLA	Mimético de LPS, ativa TLR4.	Induz respostas do tipo Th1, utilizado em vacinas contra várias doenças como HIV, malária e cancro.
CpG ODN 1081, CpG ODN 7909 e IC31	Moléculas de DNA sintéticas que ativam TLR9, levam a produção de IL-12 e interferons do tipo I	Induzem fortes respostas Th1 e CTLs, eficazes em vacinas contra HIV e outros vírus.
Toxinas Bacterianas (CT, LT)	Subunidades A e B de toxinas de <i>V. cholerae</i> e <i>E. coli</i> .	Aumentam a resposta imune ao nível das mucosas, com esforços para desenvolver versões não tóxicas para vacinas seguras.
Micropartículas/ Emulsões	Microesferas, NPs, ISCOMs, lipossomas.	Protegem os antígenos da degradação, melhoram a distribuição e o aumento da imunogenicidade.
Outros Adjuvantes Mucosos	IL-12, MDP, MPL, entre outros.	Melhoram as respostas imunes quando administrados com antígenos por via das mucosas.

6.3. Fundamentos imunológicos para a busca por novos adjuvantes vacinais

Recentes avanços na compreensão da fisiologia das respostas imunes permitem-nos identificar novos alvos para o *design* de adjuvantes modernos. As estratégias orientadas por hipóteses combinadas com a disponibilidade de modelos de camundongos transgênicos estão a gerar uma grande quantidade de informação sobre a fisiologia das respostas imunes, tanto a nível celular quanto molecular. O progresso foi feito na compreensão da imunidade inata e dos sinais pró-inflamatórios precoces, memória de células T e B, polarização Th1/Th2 e na imunidade nas superfícies mucosas, etc⁷⁸⁻⁸¹.

Os eventos pró-Inflamatórios iniciais e a imunidade inata, são considerados linhas de defesa não específica contra agentes patogênicos. Estudos recentes demonstraram amplas evidências de que os níveis de proteção fornecidos por células B e T polimórficas em resposta aos ataques de agentes patogênicos (imunidade adaptativa) dependem em grande parte da qualidade e precisão dos sinais de "perigo" iniciais percebidas por células imunes inatas no local de entrada do agente infeccioso. Portanto, imitar ou induzir eventos pró-inflamatórios iniciais e mecanismos de imunidade inata deve ser uma característica fundamental dos futuros adjuvantes⁷⁸.

Um outro fundamento imunológico é a quimioatração. As quimiocinas são moléculas estruturalmente relacionadas envolvidas no controlo do tráfego e ativação de leucócitos. Os mapas abrangentes da interação entre quimiocinas e os seus recetores foram estabelecidos para todos os subconjuntos de leucócitos humanos. Uma troca rápida e coordenada na expressão de recetores de quimiocinas é conhecida por ocorrer quando as DCs humanas amadurecem, com recetores como CCR1, CCR2, CCR5, CCR6 e CXCR5 expressos em DCs imaturas, e CXCR4 e CCR7 regulados para cima em DCs maduras^{78, 82}. Além das quimiocinas, outros fatores solúveis, como o tripéptido bacteriano *N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine* (fMetleuPhe) ou C5a, foram identificados como quimiotaxinas potentes para DCs. Agonistas para recetores de quimiocinas selecionadas podem ser usados para atrair DCs imaturas no local de injeção do antígeno, ou para controlar a migração de DCs maduras (junto com células T imaturas) e para órgãos linfoides secundários. Além disso, a fusão do antígeno com quimiocinas como a proteína quimiotática de monócitos (MCP)-3 (CCL7) ou IP10 (CXCL10) tem sido usada para direcionar o antígeno para APCs^{78, 83}. Curiosamente, além de células T imaturas e de memória, as células T Th1 e Th2 expressam padrões distintos de recetores de quimiocinas, como CXCR3 e CCR5 que são expressos em células Th1, e os recetores CCR4 e CCR3 são expressos em

células Th2. O uso de adjuvantes que mimetizam ou inibem a ligação de algumas dessas quimiocinas e os seus recetores poderiam, portanto, ser usados para polarizar as respostas das células T^{78, 84}.

Com a evolução e conhecimento da biologia das DCs e da fisiologia do processamento e apresentação de antígenos tende a haver melhoria no *design* de novas vacinas. Isto inclui a formulação de antígenos para direcionar melhor as APCs e elicitar respostas de células T específicas. Recentemente, foram identificados recetores de superfície preferencialmente expressos pelas APCs, permitindo o direcionamento do antígeno para sua internalização e apresentação às células T. Isso possibilita a ativação das APCs e aumenta as funções de apresentação de antígenos, o que é fundamental para iniciar uma resposta imune eficaz. Adjuvantes projetados para estimular respostas imunes celulares fortes devem facilitar a entrada do antígeno nas APCs e induzir a sua diferenciação para otimizar a ativação de linfócitos T imaturos. Esses adjuvantes podem ser moléculas únicas ou combinações delas, e outras estratégias, como o uso de vetores específicos ou a modificação direta do antígeno, também podem ser consideradas para direcionar as APCs. Além disso, é importante notar que adjuvantes/formulações podem induzir a maturação das DCs, aumentando as suas funções de apresentação de antígenos, e possivelmente imitando sinais associados à ajuda das células T ou à inflamação. A maturação ou “condicionamento” das APCs pode ser alcançada por meio da ligação cruzada de moléculas de CD40 com CD40L ou anticorpos anti-CD40, e após estimulação com produtos microbianos como LPS ou citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF)- α ⁷⁸.

É importante a compreensão ao nível da biologia dos TLRs e o seu impacto no *design* de adjuvantes. Alguns ligantes de TLR estão a ser testados como adjuvantes Th1, incluindo os agonistas de TLR9 contendo motivos CpG, agonistas de TLR4 como MPL e análogos sintéticos, ou agonistas de TLR7 como imidazoquinolinas. A análise dos padrões de expressão de TLRs em células imunes pode ser útil para selecionar os agonistas de TLR mais apropriados a serem usados como adjuvantes, dependendo da sua imunização. Compreender as vias de sinalização dos TLRs e realizar análises estrutura-função com análogos sintéticos de agonistas de TLR facilitará o *design* dos adjuvantes com fortes propriedades e com os mínimos efeitos adversos^{78, 85}.

É, igualmente, importante considerar o papel dos linfócitos T inatos/naturais, como as células T *natural killer* (NKT) e as células Gama/Delta T linfócitos (T $\gamma\delta$), no desenvolvimento da resposta imune. Estas células desempenham um papel fundamental na defesa contra agentes

patogénicos infecciosos e na promoção de respostas imunes eficazes. O direcionamento dessas células com adjuvantes específicos, como o glicolípido sintético α -galactosilceramida (α -GalCer) para células T NKT ou antígenos de fosfonucleotídeos para células T $\gamma\delta$, pode ser uma estratégia promissora para o desenvolvimento de vacinas eficazes^{78, 86}.

6.4. Vacinas usando nanopartículas

Com o avançar dos tempos e com os novos estudos ao nível da preparação de vacinas as atenções começam a ser direcionadas para a utilidade das NPs como sistemas de veiculação de vacinas. O antígeno vacinal é encapsulado dentro ou à superfície da NP. Ao encapsular material antigénico, as NPs fornecem um método para veicular os antígenos que, de outra forma, poderiam degradar rapidamente após a injeção ou induzir uma resposta imunológica localizada e de curta duração. A conjugação de antígenos nas NPs pode permitir a apresentação do antígeno ao sistema imunitário da mesma forma que seria apresentado pelo agente patogénico, provocando assim uma resposta semelhante. Além disso, NPs feitas de alguns compostos permitem não apenas a veiculação direcionada de antígenos, mas também a libertação prolongada dos mesmos para maximizar a exposição ao sistema imunitário. Também está a ser estudado o potencial das NPs para veicular vacinas através de métodos não tradicionais, como tópica, inalação ou veiculação ótica, bem como combinar vários antígenos na mesma partícula para proteger contra várias doenças⁸⁷.

Entre os primeiros sistemas de veiculação de NP estudados estão as VLPs (partículas semelhantes a vírus), que mostraram interesse devido à sua facilidade de produção e capacidade de estimular respostas imunológicas fortes^{87, 88}. Estas partículas compreendem um tamanho entre 20 a 150 nm. As VLPs consistem num envelope viral auto-montado, gerado a partir de uma única proteína que forma um complexo multimérico mostrando alta densidade de epítomos^{87, 89}. Ao contrário dos vírus, as VLPs montam-se sem encapsular qualquer RNA viral, o que significa que são não replicantes e não infecciosas⁸⁷.

As VLPs podem ser usadas para expressar proteínas adicionais, seja fundindo essas proteínas à partícula ou expressando múltiplos antígenos^{87, 88}.

O sistema de expressão de baculovírus é o mais usado para a geração de VLPs porque tem bom perfil de segurança, pois os baculovírus não infetam naturalmente humanos. O vírus da poliedrose nuclear múltipla de *Autographa californica* (AcMNPV) é o componente de VLP mais amplamente estudado^{87, 90}. Neste sistema, um gene não essencial codificador da proteína

formadora do corpo de oclusão viral (poliedrina) é substituído por um gene de interesse^{87, 89}. O vetor codificador da VLP modificada pode então ser usado para infectar células de inseto (Sf9 ou Sf21 derivadas de *Spodoptera frugiperda*, ou BTI-TN-5B1-4 derivadas de *Trichoplusia ni*) para gerar quantidades suficientes da proteína viral de modo a haver a auto-montagem em complexos multiméricos. A vantagem de usar este sistema é que, não apenas o AcMNPV tem um grande genoma (130 kb), permitindo a inserção de múltiplos genes grandes, mas também há tipicamente um alto rendimento proteico impulsionado pelo forte promotor de poliedrina^{87, 90}.

Apesar de sua versatilidade, a principal desvantagem do sistema de expressão de baculovírus/inseto é sua incapacidade de produzir glicoproteínas recombinantes autênticas de mamíferos devido às diferenças nos padrões de modificação pós-traducional entre células de inseto e de mamíferos⁸⁷.

Outro problema associado ao sistema de expressão de baculovírus é a morte celular resultante e a lise das células de inseto dentro de poucos dias após a infecção com baculovírus, tornando-se problemático para proteínas que são selecionadas para secreção ou são vulneráveis à degradação⁸⁷.

Os lipossomas também são muito usados por serem auto-montáveis, consistem numa bicamada fosfolipídica com um núcleo aquoso^{87, 91, 92}. Podem ser gerados como vesículas unilamelares, que consistem em uma única bicamada fosfolipídica, ou vesículas multilamelares, que são compostas por várias camadas concêntricas de fosfolipídios separadas por camadas de água. Como consequência, os lipossomas podem ser adaptados para incorporar moléculas hidrofílicas no núcleo aquoso ou moléculas hidrofóbicas dentro das bicamadas fosfolipídicas.

Os ISCOMs também são usados como sistemas de veiculação a NP^{87, 93} e têm sido usados para encapsular proteínas do envelope viral, como do vírus *herpes simplex* tipo 1, hepatite B e *influenza*. As proteínas de uma variedade de bactérias e parasitas, incluindo *Escherichia coli*, *Brucella abortus* e *Plasmodium falciparum*, também têm sido usadas para montar ISCOMs^{93, 99}, bem como, complexos sem proteínas virais que também são usados e são frequentemente referidos como matrizes de ISCOM^{87, 94}.

As NP poliméricos têm mostrado interesse pela sua capacidade de veicular medicamentos, além de serem biodegradáveis. Além disso, a cinética de libertação de medicamentos carregados em NP poliméricos pode ser controlada por mudanças na composição do copolímero. Esta classe de NP pode ser preparada a partir de uma variedade de polímeros, incluindo poli(ácidos alfa-

hidroxílicos), poli(aminoácidos) ou polissacarídeos, de modo a criar uma vesícula que pode acomodar ou exibir antígenos^{87, 95}.

Os poli(ácidos alfa-hidroxílicos) mais comumente usados para preparar NP poliméricos são PLGA ou poli(ácido láctico) (PLA), frequentemente sintetizados usando uma técnica de dupla emulsão-evaporação de solvente. O uso deste método é limitado, pois a eficácia do encapsulamento de antígenos é baixa e há a possibilidade de desnaturação de proteínas na interface óleo-água. A adição de estabilizantes como surfactantes ou açúcares, incluindo trealose e sacarose, aumenta a estabilidade contra a desnaturação mantendo a proteína hidratada na sua forma nativa⁸⁷.

Um método alternativo para manter a estabilidade da proteína encapsulada usa poli(aminoácidos) como poli(ácido gama-glutâmico) (γ -PGA), poli(ϵ -lisina), poli(L-arginina) ou poli(L-histidina), que não requerem uma etapa de emulsão na sua síntese^{87, 96}. Estes copolímeros anfifílicos auto montam-se através de interações hidrofóbicas para formar estruturas poliméricas formando um núcleo hidrofóbico e uma casca externa hidrofílica^{87, 97}. Assim, os ácidos glutâmicos ligados por γ em γ -PGA não são facilmente reconhecidos por proteases comuns, resultando em estabilidade adicional.

Polímeros de polissacarídeos hidrofílicos também são bons candidatos para a veicular vacinas, sendo escolhidos para preparar NP. Muita atenção tem sido dada às NP de quitosano por causa da sua biocompatibilidade e da sua biodegradabilidade em produtos não tóxicos *in vivo*, bem como, na sua capacidade de abrir as junções estreitas entre células epiteliais⁸⁷.

Para além das NPs formadas por materiais biológicos ou biodegradáveis, como as discutidas anteriormente, também existem as não degradáveis que também estão a ser alvo de estudo como veículo de vacinas^{87, 96}. Entre elas estão as NP de ouro, carbono e sílica, que podem encapsular antígenos ou, mais frequentemente, fornecer uma superfície para a ligação covalente⁸⁷.

As NPs de ouro podem variar consideravelmente em tamanho, mas são frequentemente usadas na faixa de 2–50 nm. Usando ácido cloroáurico como solução inicial, o ouro é reduzido para formar partículas esféricas de 10–20 nm ou 2 nm de diâmetro, dependendo do uso de um agente redutor suave ou forte. Em ambos os casos, as partículas formadas são tipicamente monodispersas e uniformes em forma, o que é essencial para manter a consistência da carga de antígenos. As partículas menores, formadas a partir do uso de um agente redutor forte, podem então ser aglomeradas para formar partículas maiores com uma razão de aspeto desejada usando

o brometo de cetiltrimetilamônio e acetato de prata ⁸⁷.

As NPs de carbono também foram investigadas como veículo de vacinas, incluindo a veiculação oral. Usando NPs de sílica como um molde, as partículas são então carbonizadas a altas temperaturas sob gás azoto e usando sacarose como fonte de carbono. A partícula resultante tem mais de 450 nm de tamanho com mesoporos de 50 nm embutidos na superfície da partícula. Dentro desses poros, um antígeno proteico pode ser protegido do ambiente agressivo do trato gastrointestinal, permitindo a administração oral para promover a imunidade mucosal ^{87,98}.

As NPs de sílica são frequentemente usadas como um modelo para a criação de NPs de carbono. Elas fornecem uma superfície robusta para a modificação com antígenos, podendo ter como função o aumento da resposta imune. Além disso, as NPs de sílica têm sido usadas para proteger antígenos proteicos da degradação, garantindo a sua veiculação eficaz e estável ao sistema imunitário⁸⁷. Na tabela 2 encontram-se sumarizados os diferentes tipos de antígenos utilizados em sistemas de veiculação de vacinas com NP.

Tabela 2- Exemplos de antígenos utilizados em sistemas de veiculação de vacinas com NP⁸⁷

Tipo de NP	Material	Antígeno	Exemplos de patogênicos
VPLs	Proteínas virais.	Proteínas virais e heterólogas.	Hepatite B, <i>Influenza</i> , HPV.
Lipossomas	Fosfolípidos.	Hidrofílicos e hidrofóbicos.	Diferentes bactérias e vírus.
ISOCOMs	Colesterol, fosfolípidos, saponina.	Proteínas virais e bacterianas.	Herpes, Hepatite B, <i>Influenza</i> , <i>E. coli</i> .
Poliméricos	PLGA, PLA, quitosano.	Proteínas, DNA, RNA.	Vários, incluindo vacinas tumorais.
Não biodegradáveis	Ouro, carbono, sílica.	Proteínas, polissacarídeos, glicoproteínas.	Vários patogênicos, aplicação em imunoterapia.

Existem limitações ao uso de NPs como veículos de vacinas que variam desde preocupações com a toxicidade das partículas até dificuldades na produção dos materiais e na apresentação de antígenos na sua forma nativa. A produção de NPs adequadas pode apresentar algumas desvantagens como o uso de linhagens de células de insetos para a expressão de VLPs. Estas são incapazes de glicosilar proteínas da mesma forma que as células de mamíferos^{87, 99}. Para outros sistemas, existem preocupações com a estabilidade ou potencial para a produção em massa. Um dos maiores obstáculos com os sistemas de veiculação de lipossomas é sua instabilidade. Uma das maneiras de superar isso é a modificação da superfície com um polímero hidrofílico, como glicol (por exemplo, polietilenoglicol, quitosano glicol). Isso serve como uma barreira para as células do sistema retículo-endotelial para estender sua vida circulatória⁸⁷.

Uma grande preocupação com a introdução de NPs em aplicações biomédicas tem sido sua toxicidade porque alguns materiais que de outra forma seriam considerados seguros adquirem características diferentes em forma nanoparticulada e às vezes podem-se tornar prejudiciais. Por exemplo, no seu estado mineral natural, o dióxido de titânio é biologicamente inerte; no entanto, quando administrado como NP com menos de 20 nm de diâmetro, ele causa uma reação inflamatória em animais e humanos. O ouro é geralmente considerado um material seguro e inerte e é usado habitualmente em implantes médicos, no entanto, NPs de ouro com um diâmetro de 1,4 nm comportam-se de uma maneira muito diferente quando atravessam as membranas celulares e nucleares e quando se ligam irreversivelmente ao DNA, causando instabilidade. Nem todas as NPs de ouro têm o mesmo comportamento, aquelas com um diâmetro ligeiramente maior (15 nm) são consideradas não tóxicas em concentrações até 60 vezes maiores⁹³.

Outras preocupações com a toxicidade associadas às NPs são a acumulação dentro das células, especialmente com exposição contínua ou uso prolongado.

Também existem preocupações mais específicas sobre os componentes usados em NPs. Apesar do número de vacinas veterinárias que utilizam ISCOMs, há incertezas sobre a toxicidade dos adjuvantes à base de saponina e isso, até o momento, tem impedido a sua licença para uso em humanos⁸⁷.

7. Vacinas no mercado

O PNV é universal gratuito e acessível a todos os residentes em Portugal. Tem como objetivo proteger a população em geral contra as doenças com maior potencial para constituir uma ameaça à saúde pública e individual¹⁰⁰.

O PNV é revisto e atualizado pela Direção-Geral da Saúde (DGS), após a proposta da Comissão Técnica de Vacinação (CTV) tendo em conta as vacinas disponíveis, bem como a frequência e distribuição das doenças no país, da evolução social e dos serviços de saúde adequados à epidemiologia das doenças e de aplicabilidade e aceitabilidade reconhecidas¹⁰⁰.

De acordo com a legislação em vigor é recomendado esquemas vacinais gerais em função da idade e do estado vacinal anterior e ainda esquemas específicos para grupos específicos ou circunstâncias especiais.

Às crianças, dependendo da idade, recomendam-se 13 vacinas. Aos adultos e durante toda a vida são recomendadas cinco vacinas. Às grávidas é recomendada uma vacina e aos grupos com risco acrescido para determinadas doenças recomendam-se ainda, para além das recomendadas à população em geral, mais quatro vacinas. Estas encontram-se resumidas na tabela 3¹⁰⁰.

Tabela 3- Vacinas recomendadas em Portugal ¹⁰⁰.

Crianças	Adultos	Grávidas	Grupos de risco
<ul style="list-style-type: none"> • Hepatite B • Difteria • Tétano • Tosse convulsa • Poliomielite • Doença invasiva por <i>Haemophilus influenzae</i> do serotipo b • Infeções por <i>Streptococcus pneumoniae</i> de 13 serotipos • Doença invasiva por <i>Neisseria meningitidis</i> do grupo B e do grupo C • Sarampo • Parotidite epidémica • Rubéola • Vacina contra infeções por vírus do Papiloma humano (HPV) 	<ul style="list-style-type: none"> • Tétano • Difteria • Sarampo • Rubéola • Poliomielite 	<ul style="list-style-type: none"> • Tosse convulsa 	<ul style="list-style-type: none"> • Tuberculose • Infeções por <i>Streptococcus pneumoniae</i> de 23 serotipos • Doença invasiva por <i>Neisseria meningitidis</i> dos grupos ACWY • Hepatite A

Dentro das presentes vacinas existem algumas que estão incluídas no PNV e outras que não estão, mas que são altamente recomendáveis. As vacinas que estão incluídas no PNV são as seguintes:

- Vacina VHB - contra a hepatite B;

- Vacina hexavalente DTPaHibVIPVHB – contra a difteria, tétano, tosse convulsa, doença invasiva por *haemophilus influenzae* tipo b, poliomielite, hepatite B;
- Vacina Pn13 – contra infeções por *streptococcus pneumoniae* de 13 serótipos;
- Vacina pentavalente DTPaHibVIP – contra a difteria, tétano, tosse convulsa, doença invasiva por *haemophilus influenzae* tipo b, poliomielite;
- Vacina Td – contra tétano e difteria;
- Vacina VASPR – contra o sarampo, parotidite epidémica e rubéola;
- Vacina MenB – contra doença invasiva por *Neisseria meningitidis* B;
- Vacina MenC – contra doença invasiva por *Neisseria meningitidis* C;
- Vacina HPV – contra infeções pelo vírus do papiloma humano ⁸.

Atualmente a vacina BCG (contra a tuberculose) faz parte do PNV apenas para grupos de risco. A avaliação da situação de risco e a vacinação com a BCG é feita nos centros de saúde ⁸.

As vacinas que não estão incluídas no PNV e que são prescritas por indicação médica são as seguintes:

- Men ACW135Y - contra a doença invasiva meningocócica (DIM);
- Rotavírus – contra a gastroenterite aguda (GEA) que é uma infeção muito comum nos primeiros anos de vida, sendo os vírus os agentes etiológicos mais frequentes;
- Gripe – contra o vírus *influenza* que pode causar infeção em qualquer grupo etário, mas com taxas de incidência mais elevadas em crianças.

Em Portugal estão disponíveis vacinas trivalentes inativadas que incluem na sua composição dois subtipos de vírus *influenza A* e um tipo de *influenza B*.

A vacinação contra a gripe é recomendada pela DGS para grupos de risco nos quais a gripe pode ser particularmente grave, nomeadamente nas crianças com mais de seis meses e adolescentes com patologias adjacentes⁹. Atualmente, em Portugal está disponível a vacina intranasal para a prevenção da gripe em crianças e adolescentes dos 24 meses até aos 18 anos. Esta vacina é administrada por pulverização nasal, utilizando vírus vivos atenuados para induzir uma resposta imunológica¹⁰¹.

- Hepatite A – Portugal é considerado um país de baixa endemicidade para esta doença estando indicadas para viajantes que vão para países com endemicidade intermédia ou alta e que tenham patologia hepática crónica, candidatos a transplante de órgão,

infetados por VIH, hemofílicos ou a receber hemoderivados ou que pertençam a comunidade onde seja detetado um surto;

- Outras vacinas para viajantes são as vacinas contra a febre-amarela e febre tifoide são disponibilizadas e administradas nos Centros de Vacinação Internacional mediante apresentação de prescrição médica;
- Vacina Tosse Convulsa (Tdpa) – para mulheres grávidas. Nos últimos anos, o reaparecimento de quadros graves e com mortalidade no recém-nascido e lactente por infecção por *Bordetella pertussis* levou à recomendação da vacina acelular. Neste caso, a principal razão para a vacinação da grávida é a proteção da criança e não da mãe⁹.

Uma outra vacina, também muito usada é a imunoterapia específica para alérgenos (SIT) é uma forma de vacinação terapêutica que requer a identificação dos alérgenos causadores da doença para a prescrição da vacina correta. Testes diagnósticos baseados em moléculas de alérgenos recombinantes permitem a determinação precisa das reatividades IgE aos alérgenos individuais, levando a uma melhor compreensão das reatividades cruzadas¹⁰².

8. Conclusão

A imunidade das mucosas desempenha um papel fundamental na proteção contra agentes patogênicos devido à sua ampla área de exposição e à integração de mecanismos imunológicos inatos e adaptativos. As vacinas ao nível das mucosas representam uma estratégia promissora no que diz respeito à indução de respostas imunes locais e sistêmicas mais eficazes, protegendo diretamente ao nível da superfície das mucosas, onde habitualmente ocorrem as primeiras interações com agentes infecciosos.

O desenvolvimento de vacinas para a imunização ao nível das mucosas enfrenta alguns desafios como a necessidade de superar barreiras anatómicas e imunológicas. As vacinas orais e nasais, têm demonstrado alguma eficácia apesar dos grandes desafios associados como a degradação enzimática. A incorporação de tecnologias avançadas, como vacinas com DNA e RNA, aumentam as opções disponíveis no mercado, aumentando o alcance da imunização.

A microbiota intestinal surge como um fator crítico na modulação da imunidade induzida pela vacinação. Em países em vias de desenvolvimento, onde a desnutrição e as enteropatias ambientais são prevalentes, a eficácia das vacinas pode ser comprometida. A aplicação de estratégias que integram o impacto da microbiota na formulação e a aplicação de vacinas podem melhorar a eficácia, principalmente em crianças e populações mais vulneráveis.

Os adjuvantes têm um grande papel no que diz respeito a amplificação da resposta imune vacinal. Os lipossomas, NPs e ativação dos TLRs aumentam a imunogenicidade, enquanto os adjuvantes específicos como o quitosano, facilitam a veiculação de antígenos ao nível da mucosa facilitando respostas imunológicas locais mais robustas e direcionadas.

Os sistemas de veiculação de vacinas, como as NPs, visam a proteção de antígenos contra a degradação permitindo a libertação controlada. Estas partículas mimetizam a estrutura de agentes patogênicos naturais, promovendo respostas imunológicas robustas e direcionadas, além de possibilitarem a integração de antígenos e adjuvantes em uma única estrutura, aumentando a eficácia e minimizando efeitos adversos.

A evolução imunológica moderna, como o papel da microbiota e a utilização de novas tecnologias emergentes incluindo as partículas biodegradáveis e vacinas comestíveis, amplia as possibilidades de sucesso na proteção contra doenças infecciosas. No entanto, os desafios permanecem, como a degradação dos antígenos ao nível das mucosas e a influência de fatores ambientais e da microbiota nas respostas imunológicas.

O PNV é universal, gratuito e acessível a todos os residentes em Portugal, visando proteger a população contra doenças com grande potencial de impacto na saúde pública e individual. O PNV é atualizado regularmente pela DGS, com base em recomendações da Comissão Técnica de Vacinação, considerando a epidemiologia, evolução social e científica, e a aplicabilidade das vacinas. As vacinas fora do programa, são recomendadas mediante prescrição médica e complementam as opções disponíveis, garantindo proteção específica para grupos e situações particulares.

Em suma, as vacinas para a imunização ao nível das mucosas representam um avanço promissor no controle de doenças infecciosas, combinando inovação tecnológica com compreensão imunológica. Elas têm o potencial de transformar paradigmas de saúde pública, contribuindo para a redução de morbidade e mortalidade a nível global, especialmente em cenários onde a prevenção é crítica. O investimento contínuo em pesquisa, desenvolvimento e acessibilidade será essencial para maximizar os benefícios dessa abordagem revolucionária.

9. Bibliografia

1. Li M, Wang Y, Sun Y, Cui H, Zhu SJ, Qiu HJ. Mucosal vaccines: Strategies and challenges. *Immunol Lett.* 2020;217; 2019:116–25.
2. Donnelly RF. Vaccine delivery systems. *Hum Vaccin Immun other.* 2017; 13:17–8.
3. Correa VA, Portilho AI, De Gaspari E. Vaccines, adjuvants and key factors for mucosal immune response. *Immunology.* 2022;167(2):124–38.
4. Kim TH, Johnstone J, Loeb M. Vaccine herd effect. *Scand J Infect Dis.* 2011; 43:683–9.
5. Gouveia A, Lott B, Semedo F, Inácio F, Freitas G, Plácido G, et al. Administração de vacinas e de outros medicamentos injetáveis por farmacêuticos - UMA ABORDAGEM PRÁTICA. *Administração de vacinas e de outros medicamentos injetáveis por farmacêuticos - UMA ABORDAGEM PRÁTICA.* 2022.
6. Elphick DA, Mahida YR. Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut.* 2005;54(12):1802–1809.
7. Uren TK, Johansen F-E, Wijburg OLC, Koentgen F, Brandtzaeg P, Strugnell RA. Role of the Polymeric Ig Receptor in Mucosal B Cell Homeostasis. *J Immunol.* 2003;170(5):2531–9.
8. Programa nacional de vacinação [Internet]. Hospital da Luz: c17 de setembro de 2020 [consultado a 31 de maio de 2024]. Disponível em <https://www.hospitaldaluz.pt/pt/dicionario-de-saude/programa-nacional-de-vacinacao>.
9. Programa nacional de vacinação [Internet]. Lusíadas: [consultado a 31 de maio de 2024]. Disponível em <https://www.lusidas.pt/blog/prevencao-estilo-vida/saude-familia/saibatudo-sobre-programa-nacional-vacinacao>
10. Burney Le. Oral poliovirus vaccine. *Public Health Rep.* 1960; 75:869–71.
11. Li M, Wang H, Tian L, Pang Z, Yang Q, Huang T, et al. COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects. Vol. 7, *Signal Transduction and Targeted Therapy.* Springer US; 2022.
12. Ribeiro, José Luis Pais. *Metodologia de investigação em psicologia e saúde.* 3º edição. Porto. Livpsic, junho de 2010 - 170 p.; 23 cm.
13. Tsai CJY, Loh JMS, Fujihashi K, Kiyono H. Mucosal vaccination: onward and upward. *Expert Rev Vaccines* [Internet]. 2023;22(1):885–99. Available from: <https://doi.org/10.1080/14760584.2023.2268724>

14. Dahlgren U, Carlsson B, Jalil F, MacDonald R, Mascart-Lemone F, Nilsson K, et al. Induction of the mucosal immune response. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1989;146: 155–60.
15. Chen H. Recent advances in mucosal vaccine development. *J Control Release*. 2000;67(2–3):117–28.
16. J. Nugent, A.L. Po, E.M. Scott, Design and delivery of non-parenteral vaccines, *J. Clin. Pharm. Ther.* 23 (4); 1998 257–285.
17. Zhao K, Xie Y, Lin X, Xu W. The Mucoadhesive Nanoparticle-Based Delivery System in the Development of Mucosal Vaccines. *Int J Nanomedicine*. 2022;(17): 4579–98.
18. R.I. Walker, New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization, *Vaccine* 12 (5); 1994: 387–400.
19. A. Frey, M.R. Neutra, Targeting of mucosal vaccines to Peyer’s patch M cells, *Behring Inst. Mitt* 98 (1997) 376– 389.
20. Brandtzaeg P. Role of secretory antibodies in the defence against infections. *Int J Med Microbiol*. 2003;293(1):3–15.
21. Kilian M, Reinholdt J, Lomholt H, Poulsen K, Frandsen EVG. Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: Critical evaluation of experimental evidence. *Apmis*. 1996;104(5):321–38.
22. Johansen FE, Pekna M, Norderhaug IN, Haneberg B, Hietala MA, Krajci P, et al. Absence of epithelial immunoglobulin a transport, with increased mucosal leakiness, in polymeric immunoglobulin receptor/secretory component-deficient mice. *J Exp Med*. 1999;190(7):915–21.
23. Brandtzaeg P. Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. *Apmis*. 1995;103(1–6):1–19.
24. Norderhaug, I. N., Johansen, F.-E., Schjerven, H., Brandtzaeg, P.: Regulation of the formation and external transport of secretory immunoglobulins. *Crit. Rev. Immunol*. 19; 1999: 481–508
25. Ha, C. L., Woodward, B.: Depression in the quantity of intestinal secretory IgA and in the expression of the polymeric immunoglobulin receptor in caloric deficiency of the weanling mouse. *Lab. Invest*. 78; 1998: 1255–1266.
26. Mazanec MB, Nedrud JG, Kaetzel CS, Lamm ME. A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunol Today*. 1993;14(9):430–5.

27. Mazzoli, S., Trabattoni, D., Lo Caputo, S., Piconi, S., Blew, C., Meacci, F., Ruzzante, S., Salvi, A., Semplici, F., Longhi, R., Fusi, M. L., Tofani, N., Biasin, M., Villa, M. L., Mazzotta, F., Clerici, M.: HIV-specific mucosal and cellular immunity in HIV-seronegative partners of HIV-seropositive individuals. *Nature Med.* 3, 1997: 1250–1257.
28. Lycke, N., Erlandsson, L., Ekman, L., Schon, K., Leanderson, T.: Lack of J chain inhibits the transport of gut IgA and abrogates the development of intestinal antitoxic protection. *J. Immunol.* 163, 1999: 913–919.
29. Uren TK, Johansen F-E, Wijburg OLC, Koentgen F, Brandtzaeg P, Strugnell RA. Role of the Polymeric Ig Receptor in Mucosal B Cell Homeostasis. *J Immunol.* 2003;170(5):2531–9.
30. Wang T, Wei F, Liu J. Emerging role of mucosal vaccine in preventing infection with avian influenza A viruses. *Viruses.* 2020;12(8):1–20.
31. Uddin M, Allon A, Roni MA, Kouzi S. Overview and future potential of fast dissolving buccal films as drug delivery system for vaccines. *J Pharm Pharm Sci.* 2019;22(1):388–406.
32. Jazayeri SD, Lim HX, Shameli K, Yeap SK, Poh CL. Nano and Microparticles as Potential Oral Vaccine Carriers and Adjuvants Against Infectious Diseases. *Front Pharmacol.* 2021;12(June):1–15.
33. Tsai CJY, Loh JMS, Fujihashi K, Kiyono H. Mucosal vaccination: onward and upward. *Expert Rev Vaccines [Internet].* 2023;22(1):885–99.
34. Paris AL, Colomb E, Verrier B, Anjuère F, Monge C. Sublingual vaccination and delivery systems. *J Control Release.* 2021; 332:553–62.
35. Czerkinsky C, Çuburu N, Kweon M-N, Anjuere F, Holmgren J. Sublingual vaccination. *Hum Vaccin.* 2011;7(1):110–4.
36. DeRisi Joseph, Penland Lolita BPO, Tyagi S, Kramer FR, Group NP, DeRisi Joseph, Penland Lolita BPO. © 1997 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturemedicine>. Group [Internet]. 1996; 4:303–8.
37. Jia Y, Krishnan L, Omri A. Nasal and pulmonary vaccine delivery using particulate carriers. *Expert Opin Drug Deliv.* 2015;12(6):993–1008.
38. Rodríguez-Gascón A, del Pozo-Rodríguez A, Isla A, Solinís MA. Vaginal gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev [Internet].* 2015;92(7):71–83.
39. Denis F, Alain S, Ploy MC. New routes of administration: Epidermal, transcutaneous mucosal ways of vaccination. *Medecine/Sciences.* 2007;23(4):379–85.
40. Poles J, Alvarez Y, Hioe CE. Induction of intestinal immunity by mucosal vaccines as a means of controlling HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2014;30(11):1027–40.

41. Li M, Wang H, Tian L, Pang Z, Yang Q, Huang T, Fan J, Song L, Tong Y, Fan H. COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 May 3;7(1):146.
42. Zhao T, Cai Y, Jiang Y, He X, Wei Y, Yu Y, et al. Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1).
43. McKee, A. S., Munks, M. W. & Marrack, P. How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants. *Immunit.* 2007; 27: 687–690.
44. Pulendran, B., S Arunachalam, P. & O’Hagan, D. T. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2021;20; 454–475.
45. Glenny, A., Pope, C., Waddington, H. & Wallace, U. Immunological notes. xvii–xxiv. *J. Pathol. Bacteriol.* 1926; 29; 31–40.
46. Iwasaki, A. & Omer, S. B. Why and How Vaccines Work. *Cell.* 2020; 183; 290–295.
47. Coffman, R. L., Sher, A. & Seder, R. A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity.* 2010; 33; 492–503.
48. Bachmann, M. F. & Jennings, G. T. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10; 787–796
49. Aoshi T. Modes of Action for Mucosal Vaccine Adjuvants. *Viral Immunol.* 2017;30(6):463–70.
50. 1. Cai X, Chiu YH, Chen ZJ. The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling. *Mol Cell [Internet].* 2014;54(2):289–96.
51. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell [Internet].* 2010;140(6):805–20.
52. Mazzini E, Massimiliano L, Penna G, Rescigno M. Oral Tolerance Can Be Established via Gap Junction Transfer of Fed Antigens from CX3CR1+ Macrophages to CD103+ Dendritic Cells. *Immunity [Internet].* 2014;40(2):248–61.
53. Ye L, Zeng R, Bai Y, Roopenian DC, Zhu X. Efficient mucosal vaccination mediated by the neonatal Fc receptor. *Nat Biotechnol.* 2011;29(2):158-63.
54. Suzuki H, Watari A, Hashimoto E, Yonemitsu M, Kiyono H, Yagi K, et al. C-terminal clostridium perfringens enterotoxin-mediated antigen delivery for nasal pneumococcal vaccine. *PLoS One.* 2015;10(5):1–13.
55. J. Nugent, A.L. Po, E.M. Scott, Design and delivery of non-parenteral vaccines, *J. Clin. Pharm. Ther.* 23 (4), 1998: 257–285.
56. H.S. Mason, D.M. Lam, C.J. Arntzen, Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (24), 1992; 11745–11749.

57. H.S. Mason, J.M. Ball, J.J. Shi, X. Jiang, M.K. Estes, C.J. Arntzen, Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (11), 1996: 5335–5340.
58. S. Castanon, M.S. Marin, J.M. Martin-Alonso, J.A. Boga, R. Casais, J.M. Humara, R.J. Ordas, F. Parra, Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus, *J. Virol.* 73 (5), 1999: 4452–4455.
59. T. Arakawa, D.K. Chong, W.H. Langridge, Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine, *Nat. Biotechnol.* 16 (3), 1998; 292–297, Published erratum appears in *Nat Biotechnol* 1998;16(5):478.
60. E.F. Fynan, R.G. Webster, D.H. Fuller, J.R. Haynes, J.C. Santoro, H.L. Robinson, DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (24), 1993; 11478–11482.
61. Zhao T, Cai Y, Jiang Y, He X, Wei Y, Yu Y, et al. Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1).
62. Longhi, M. P. et al. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4⁺ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *J. Exp. Med.* 2009; 206; 1589–1602.
63. Kumar, H. et al. Cutting edge: cooperation of IPS-1-and TRIF-dependent pathways in poly IC-enhanced antibody production and cytotoxic T cell responses. *J. Immunol.* 2008; 180; 683–687.
64. Wang, Y., Cella, M., Gilfillan, S. & Colonna, M. Cutting edge: polyinosinic: poly cytidylic acid boosts the generation of memory CD8 T cells through melanoma differentiation-associated protein 5 expressed in stromal cells. *J. Immunol.* 2010; 184; 2751–2755.
65. J. Cleland, Design and production of single-immunization vaccines using polylactide polyglycolide microsphere systems, in: M.F. Powell, M.J. Newman (Eds.), *Vaccine Design: the Subunit and Adjuvant Approach*, Plenum Press, New York, 1995, pp. 439–462.
66. Watarai S, Han M, Kodama T, Kodama H. Antibody response in the intestinal tract of mice orally immunized with antigen associated with liposomes. *J Vet Med Sci.* 1998;60(9):1047–50.
67. Harokopakis E, Hajishengallis G, Michalek SM. Effectiveness of liposomes possessing surface-linked recombinant B subunit of cholera toxin as an oral antigen delivery system. *Infect Immun.* 1998;66(9):4299–304.
68. E. Okada, S. Sasaki, N. Ishii, I. Aoki, T. Yasuda, K. Nishioka, J. Fukushima, J. Miyazaki, B. Wahren, K. Okuda, Intranasal immunization of a DNA vaccine with IL-12- and

- granulocyte–macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) expressing plasmids in liposomes induces strong mucosal and cell-mediated immune responses against HIV-1 antigens, *J. Immunol.* 159 (7), 1997: 3638–3647.
69. J. Okada, S. Cohen, R. Langer, In vitro evaluation of polymerized liposomes as an oral drug delivery system, *Pharm. Res.* 12 (4), 1995: 576–582.
 70. McI Mowat A, Smith RE, Donachie AM, Furrie E, Grdic D, Lycke N. Oral vaccination with immune stimulating complexes. *Immunol Lett.* 65(1–2), 1999: 133–40.
 71. K.F. Hu, J. Ekstrom, M. Merza, K. Lovgren-Bengtsson, B. Morein, Induction of antibody responses in the common mucosal immune system by respiratory syncytial virus immunostimulating complexes, *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 187 (4), 1999; 191–198.
 72. Zhao T, Cai Y, Jiang Y, He X, Wei Y, Yu Y, et al. Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1).
 73. Xiao, L. et al. Biomimetic cytomembrane nanovaccines prevent breast cancer development in the long term. *Nanoscale.* 2021; 13; 3594–3601.
 74. Wang, Y., Cella, M., Gilfillan, S. & Colonna, M. Cutting edge: polyinosinic: poly cytidylic acid boosts the generation of memory CD8 T cells through melanoma differentiation-associated protein 5 expressed in stromal cells. *J. Immunol.* 2010; 184; 2751–2755
 75. Bode, C. et al. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev. Vaccines.* 2011; 10; 499–511.
 76. A. Fukushima, Y.C. Yoo, K. Yoshimatsu, K. Matsuzawa, M. Tamura, S. Tono-oka, K. Taniguchi, S. Urasawa, J. Arikawa, I. Azuma, Effect of MDP-Lys(L18) as a mucosal immuno adjuvant on protection of mucosal infections by Sendai virus and rotavirus, *Vaccine* 14 (6), 1996: 485–491.
 77. G.L. Barchfeld, A.L. Hessler, M. Chen, M. Pizza, R. Rappuoli, G.A. Van Nest, The adjuvants MF59 and LT-K63 enhance the mucosal and systemic immunogenicity of subunit influenza vaccine administered intranasally in mice, *Vaccine* 17 (7–8), 1999: 695–704.
 78. Burdin N, Guy B, Moingeon P. Immunological foundations to the quest for new vaccine adjuvants. *BioDrugs.* 2004;18(2):79–93.
 79. Schijns V. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 456-63.
 80. Moingeon P, Haensler J, Lindberg A. Towards the rational design of Th1 adjuvants. *Vaccine* 2001; 19: 4363-72.
 81. Moingeon P. Strategies for designing vaccines eliciting Th1 responses in humans. *J Biotechnol* 2002; 98: 189-98

82. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2760-9.
83. Sozzani L, Sallusto F, Luini W, et al. Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. *J Immunol* 1995; 155 (7): 3292-5.
84. Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 1998; 19 (12): 568-74.
85. Janeway Jr CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216.
86. Gonzalez-Aseguinolaza G, Van Kaer L, Bergmann CC, et al. Natural killer T cell ligand alpha-galactosylceramide enhances protective immunity induced by malaria vaccines. *J Exp Med* 2002; 195 (5): 617-24.
87. Gregory AE, Titball R, Williamson D. Vaccine delivery using nanoparticles. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;4(MAR):1–13.
88. Kingsman, S. M., and Kingsman, A. J. Polyvalent recombinant antigens: a new vaccine strategy. *Vaccine.* 1988; 6: 304–306.
89. Grgacic, E. V. L., and Anderson, D. A. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods.* 2006; 40: 60–65.
90. Hu, Y. C. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 2005; 26: 405–416.
91. Henriksen-Lacey, M., Korsholm, K. S., Andersen, P., Perrie, Y., and Christensen, D. Liposomal vaccine delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2011; 8: 505–519.
92. Heurtault, B., Frisch, B., and Pons, F. Liposomes as delivery systems for nasal vaccination: strategies and outcomes. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2010; 7: 829–844.
93. Kersten, G. F., and Crommelin, D. J. Liposomes and ISCOMS as vaccine formulations. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995; 1241: 117–138.
94. Barr, I.G., Sjölander, A., and Cox, J.C. ISCOMs and other saponin based adjuvants. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998; 32: 247–271.
95. X., Deng, X., Yuan, M., Xiong, C., Huang, Z., Zhang, Y., et al. In vitro degradation and release profiles of poly-DL-lactide poly(ethylene glycol) microspheres with entrapped proteins. *J. Appl. Polym. Sci.* 2000; 78: 140–148.
96. Lee, P.-W., Hsu, S.-H., Tsai, J.-S., Chen, F.-R., Huang, P.-J., Ke, C.-J., et al. Multifunctional core-shell polymeric nanoparticles for transdermal DNA delivery and epidermal Langerhans cells tracking. *Biomaterials.* 2010; 31: 2425–2434.

97. Lu, J. M., Wang, X., Marin-Muller, C., Wang, H., Lin, P. H., Yao, Q., et al. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2009; 9: 325–341.
98. Wang, T., Zou, M., Jiang, H., Ji, Z., Gao, P., and Cheng, G. Synthesis of a novel kind of carbon nanoparticle with large meso pores and macropores and its application as an oral vaccine adjuvant. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2011; 44: 653–659.
99. Palmberger, D., Wilson, I. B. H., Berger, I., Grabherr, R., and Rendic, D. SweetBac: a new approach for the production of mammalian glycoproteins in insect cells. *PLoS ONE* 2012; 7: e34226.
100. Ministério da Saúde. Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional de Vacinação 2020. 2020 [Internet]. 2020;1–108. Available from: <https://www.ordemenfermeiros.pt/media/20070/pnv-2020-set-2020.pdf>
101. Carter NJ, Curran MP. Live Attenuated Influenza Vaccine (FluMist®; Fluenz™). *Drugs.* 2011;71(12):1591–622.
102. Linhart B, Valenta R. Vaccines for allergy. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2012;24(3):354–60.